

Université de Montréal

**Analyse comparative pour comprendre la résistance des jonctions
neuromusculaires des muscles extraoculaires dans la sclérose
latérale amyotrophique**

par

Frédéric Provost

Département de neurosciences

Faculté de médecine

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade MSc

en Neurosciences

Avril 2020

© Frédéric Provost, 2020

Ce mémoire intitulé

Analyse comparative pour comprendre la résistance des jonctions neuromusculaires des muscles extraoculaires dans la sclérose latérale amyotrophique

Présenté par

Frédéric Provost

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Bénédicte Amilhon

Président-rapporteur

Richard Robitaille

Directeur de recherche

Martine Tétreault

Membre du jury

Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie touchant spécifiquement les motoneurones (MN) qui se caractérise par la perte précoce des jonctions neuromusculaires (JNMs) et menant à une paralysie musculaire. La dénervation des JNMs des muscles squelettiques se produit en amont de la mort des MN de la moelle épinière. Des études récentes publiées ont révélé une altération de la transmission synaptique, une instabilité de la morphologie des JNMs ainsi que des mécanismes de réparations de la JNMs inappropriés dans le modèle SOD1, et ce avant l'apparition des symptômes moteurs. De manière intéressante, ces mécanismes sont régulés par les cellules de Schwann périssynaptiques (CSPs), la cellule gliale présente à la JNM suggérant ainsi que l'altération des fonctions des CSPs peut contribuer à la vulnérabilité des JNMs. Tandis que de nombreuses études ont démontré une susceptibilité à la dénervation qui est dépendante du type d'unité motrice (UM), l'innervation des muscles extraoculaires (EOMs) montre une importante résistance à la progression de la maladie.

Afin d'investiguer les distinctions dans les JNMs des EOMs menant à cette résistance, nous avons procédé à une analyse de la morphologie des JNMs via microscopie confocale, nous avons étudié les propriétés fonctionnelles des CSPs par imagerie calcique ainsi qu'effectuer une analyse différentielle du protéome entre les JNMs résistantes de l'EOM et les JNMs vulnérables du *soleus* (SOL) ou de l'*extensor digitorum longus* (EDL) dans la souris SOD1^{G37R}. Peu de dénervation des JNMs et aucune altération des JNMs sont observées dans l'EOM à un stade tardif de la maladie. Contrairement aux muscles vulnérables, la sensibilité des CSPs suite à l'application locale d'ATP et de muscarine n'est pas altérée dans les EOM. L'analyse du protéome entre l'EDL et l'EOM au stade symptomatique démontre des fonctions cellulaires distinctes. Dans l'EDL, au stade symptomatique, les cascades cellulaires catabolique et reliée au protéosome sont augmentées : reflétant le processus de dénervation en cours dans ce muscle. Dans l'EOM, une diminution de l'expression de SOD1 muté, une augmentation des processus d'oxydoréductions, des protéines importantes pour maintien du repliement des protéines, des neurofilaments ainsi qu'une expression distincte des enzymes régulant les neurotransmetteurs est observée dans les JNMs résistantes.

Ainsi, comprendre les fonctions des CSPs ainsi que les profils d'expression protéomique distincte entre les JNMs vulnérables et résistantes durant la progression de la maladie peut nous fournir des informations sur les mécanismes impliqués durant la dénervation et aider à identifier les protéines potentielles qui peut favoriser la réparation et l'intégrité des JNMs. Ainsi, cette étude peut mener à l'identification de biomarqueur musculaire et de cible thérapeutique potentielle pour des perspectives curatives futures.

Mots-clés : Sclérose Latérale Amyotrophique, cellules de Schwann périssynaptique, jonctions neuromusculaires, muscles extraoculaires

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a motor neuron (MNs) disease characterized by the precocious loss of neuromuscular junctions (NMJs) and muscular paralysis. The denervation of NMJs at striated muscles is an early event that occurs before the loss of spinal cord MNs. Recent data revealed an alteration of synaptic transmission, morphological instability and inappropriate repair in NMJs of SOD1 mice model prior to motor symptoms. Interestingly, these mechanisms are known to be regulated by Perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at NMJs, suggesting that the alteration of PSC functions may contribute to NMJ vulnerability. While numerous studies demonstrated a motor unit type-dependent susceptibility to denervation, the extraocular muscles (EOM) innervation shows a prominent resistance to disease progression. We hypothesized that PSCs functions and intrinsic properties at extraocular NMJs contribute to the resistance of the disease progression.

NMJ morphological analysis by immunostaining and confocal imaging, functional properties of PSCs by calcium imaging and a differential proteomic analysis using Tandem Mass Tags coupled to quantitative mass spectrometry was performed between the resistant EOM and the vulnerable, *soleus* (SOL) or *Extensor digitorum longus* (EDL) muscles in SOD1^{G37R} mice. Fewer denervated NMJs and no alteration of NMJ integrity was observed in the EOM in comparison to the EDL. Sensitivity of EOM PSC to local application of ATP and muscarine are not altered in the EOM SOD1^{G37R} in comparison to WT suggesting an adequate decoding of synaptic activity of PSC. Proteomics analysis between EDL and EOM at symptomatic stage demonstrates distinct cellular pathway. In the EDL, at symptomatic stage, catabolism and proteasome cellular pathways are upregulated reflecting the undergoing denervation processes observed. In the EOM, overall lower expression of SOD1, up-regulation of oxidoreduction process, of mechanism against protein unfolding, of neurofilament and distinct expression of enzymes regulating neurotransmitter homeostasis is observed in the resistant NMJ.

Understanding PSC functions and investigating the distinctive protein expression profile between vulnerable and resistant NMJs during disease progression will help provide insights into the denervation mechanisms involved and help identify potential proteins that could favor NMJ repair and integrity. Also, this study may lead to the identification of muscle biomarkers and potential therapeutic targets moving toward curative perspectives.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis, Perisynaptic Schwann cell, Neuromuscular junctions, Extraocular muscles

Table des matières

Résumé	I
Abstract	III
Table des matières	V
Liste des tableaux	XI
Liste des figures	XIII
Liste des sigles et abréviations	XIV
Remerciements	XV
Chapitre 1 - Introduction	1
1.1 Préambule.....	1
1.2 La sclérose latérale amyotrophique	2
1.2.1 Information générale	2
1.2.1.1 Historique et information épidémiologique	2
1.2.1.2 Diagnostic et outils utilisés	2
1.2.2 Les différentes présentations de la sclérose latérale amyotrophique	3
1.2.2.1 Les atteintes spinales	4
1.2.2.2 Les atteintes bulbaires	4
1.2.2.3 Les atteintes des lobes frontotemporaux.....	5
1.2.3 Les principales mutations répertoriées et les mécanismes de toxicités.....	5
1.2.3.1 TARDBP	6
1.2.3.2 C9ORF72	7
1.2.3.3 SOD1	7
1.2.3.4 Les modèles pathophysiologiques.....	8
1.2.3.5 Les mécanismes pathophysiologiques de la SLA	9
1.2.3.5.1 L'excitotoxicité glutamatergique	12

1.2.3.5.2	Dérèglement du contrôle qualité des protéines	13
1.2.3.5.3	Altération du transport axonal, désorganisation cytosquelette et du trafic des vésicules synaptiques	14
1.2.3.5.4	Dérèglement du métabolisme d'ARN	14
1.2.3.5.5	Mécanismes de toxicité spécifique retrouvés dans les modèles SOD1: les dysfonctions mitochondriales et le stress oxydatifs	15
1.2.4	Mort cellulaire non-autonome	16
1.2.4.1	Les astrocytes	17
1.2.4.2	Les microglies	19
1.2.4.3	Les oligodendrocytes.....	21
1.2.4.4	Les cellules de Schwann	21
1.2.4.5	Les cellules musculaires.....	22
1.2.5	Atteinte différentielle de la dénervation.....	23
1.3	Les muscles oculomoteurs	25
1.3.1	Neuroanatomie et physiologie générale des muscles extraoculaires	25
1.3.2	Les unités motrices des muscles oculomoteurs.....	27
1.3.3	Particularités des MN et UM spécifiques aux muscles oculomoteurs	28
1.3.3.1	Caractéristiques des plaques motrices en grappe	30
1.3.4	EOM et leur atteinte tardive dans la SLA	32
1.3.4.1	Les particularités des MNs des noyaux oculomoteurs	32
1.3.4.2	Les atteintes observées dans les muscles extraoculaires.....	33
1.3.4.3	Les atteintes gliales dans le tronc cérébral	34
1.3.5	Les JNMs.....	35
1.3.5.1	L'élément présynaptique : la terminaison axonale.....	35
1.3.5.2	L'élément postsynaptique : la fibre musculaire	37
1.3.5.3	L'élément glial : la cellule de Schwann périssynaptique.....	38

1.4	Les cellules de Schwann Perisynaptiques	40
1.4.1	Caractéristiques générales des CSPs	41
1.4.2	CSP détecte l'activité synaptique à la JNM	41
1.4.3	CSP décode l'activité synaptique à la JNM	42
1.4.4	CSP module les différents éléments synaptiques à la JNM	43
1.4.4.1	CSP module la libération de neurotransmetteurs	43
1.4.4.2	CSP module les mécanismes de plasticité à court-terme	43
1.4.5	L'adaptabilité des CSPs	44
1.4.5.1	Le rôle des CSPs dans la formation et la maintenance de la JNM	45
1.4.5.2	Le rôle des CSPs durant les processus de réparations des JNMs	46
1.5	Les altérations des JNMs dans la SLA	49
1.5.1	Les réorganisations synaptiques	49
1.5.2	Les altérations synaptiques	49
1.5.3	La dénervation : un processus dynamique	50
1.5.4	L'implication des CSPs dans la SLA	52
1.6	Objectifs	54
Chapitre 2 - Matériel et Méthode		56
2.1	Animaux	56
2.1.1	La lignée employée	56
2.1.2	Description des stades de la SLA dans les modèles murins	56
2.2	Préparations neuromusculaires des muscles oculomoteurs	57
2.2.1	Dissection générale	57
2.2.2	Préparation des tissus pour l'imagerie calcique	60
2.3	Marquage immunohistochimique des JNMs	61
2.4	Analyse morphologique des JNMs	63

2.5	Imagerie calcique des CSPs	64
2.6	Extraction protéique	65
2.7	Détermination du profil d'expression protéique	65
2.7.1	Digestion Tryptique.....	65
2.7.2	Marquage TMT	66
2.7.3	Analyses LC-MS/MS	66
2.7.4	Identification des Protéines	67
2.7.5	Quantification des Protéines.....	67
2.7.6	Analyses Bio-informatiques	67
2.7.7	Analyse des fonctions.....	68
2.8	Analyse statistique.....	68
Chapitre 3 - Résultats		69
3.1	Propriétés morphologiques des JNMs des muscles extraoculaires	69
3.1.1	Innervation des JNMs des muscles extraoculaires	72
3.1.2	Innervation de la plaque motrice des JNMs des muscles extraoculaires	72
3.1.3	Morphologie gliale des JNMs des muscles extraoculaires.....	73
3.2	Analyse de l'activité des CSPs dans les JNMs des muscles extraoculaires.....	73
3.2.1	L'activation purinergique des CSPs des JNMs des muscles extraoculaires demeure inchangée.....	74
3.2.2	L'activation muscarinique des CSPs à la muscarine demeure inchangée.....	75
3.3	Analyse comparative d'expression de protéines dans entre les JNMs vulnérables et résistantes dans la SLA	77
3.3.1	Analyse protéomique comparative exhaustive.....	79
3.3.1.1	Distribution intracellulaire des protéines identifiées.....	79
3.3.1.2	Protéines identifiées reliées à la SLA.....	80
3.3.1.3	Les différences d'expression protéiques	82

3.3.2	Les différences intrinsèques entre EOM et EDL retrouvées chez la préparation neuromusculaire saine	85
3.3.3	Les différences intrinsèques entre EOM et EDL maintenues durant le stade symptomatique	90
3.3.4	Les différences des protéomes du EOM et du EDL dans la SLA	94
3.3.5	Les atteintes dans l'EDL au stade symptomatique de la SLA	97
3.3.6	L'EOM : les cascades moléculaires altérées dans la SLA	101
Chapitre 4 - Discussion		104
4.1	Résumé des résultats	104
4.2	Les muscles vulnérables : Dénervations, Réinnervation et Vulnérabilité sélective.....	104
4.2.1	Les processus de dénervation dans les muscles vulnérables	105
4.2.2	Les processus de réinnervation dans les muscles vulnérables	106
4.2.3	Vulnérabilité sélective – Facteurs neurotoxiques.....	107
4.3	Les muscles extraoculaires: adaptabilité menant à une atteinte tardive?	109
4.3.1	Atteintes morphologiques tardives.....	109
4.3.2	Mécanismes cellulaires pouvant expliquer le maintien des EOMs.....	110
4.3.2.1	Expression différentielle de SOD1	110
4.3.2.2	Maintien de l'excitabilité neuronale.....	110
4.3.2.3	Excitotoxicité glutamatergique	111
4.3.2.4	Maintien des éléments synaptiques et axonaux.....	113
4.3.2.4.1	Stabilité et transport axonal.....	114
4.3.2.4.2	Stabilité synaptique	115
4.3.3	Les cellules de Schwann pérисynaptique et leur rôle dans la SLA.....	116
4.3.3.1	Décodage synaptique des CSPs : atteinte différentielle dans les muscles vulnérables versus résistants	116
4.3.3.2	Hyperactivation muscarinique – Phénomène protecteur ou délétère	117

4.3.3.2.1	Phénomène protecteur de l'hyperactivation muscarinique	118
4.3.3.2.2	Phénomène délétère de l'hyperactivation muscarinique	119
4.3.3.3	Modulation des CSPs – Défi à venir	120
4.3.4	Le système des endocannabinoïdes	122
4.3.4.1	Les endocannabinoïdes et leur implication dans la SLA	122
4.3.4.2	Les endocannabinoïdes et leur rôle à la JNM	123
4.4	Conclusion.....	125
Références bibliographiques		126
Chapitre 5 - Annexes		150

Liste des tableaux

Tableau 2.1	Critères d'évaluations de la morphologie des différents éléments de la JNM	63
Tableau 3.1	Analyse morphologique des JNMs des muscles extraoculaires.....	71
Tableau 3.2	Préparations neuromusculaires isolées.....	77
Tableau 3.3	Enrichissement des processus, fonctions et composantes intracellulaires des 635 protéines qui sont augmentés dans le EOM WT versus EDL WT	87
Tableau 3.4	Enrichissement des processus, fonctions et composantes intracellulaires des 59 protéines qui sont augmentés dans le EDL WT versus EOM WT	89
Tableau 3.5	Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 504 protéines qui sont augmentés dans le EDL WT versus EOM WT et SOD1	93
Tableau 3.6	Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 32 protéines qui sont augmentés dans le EDL WT versus EOM WT et SOD1	93
Tableau 3.7	Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 231 protéines qui sont exclusivement différentes entre le WT et SOD1 chez l'EDL	99
Tableau 3.8	Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 207 protéines qui sont différentes entre le WT et SOD1 chez l'EDL ainsi que différentes entre l'EDL et l'EOM chez le WT et chez le SOD1	100
Tableau 3.9	Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 110 protéines qui sont différentes entre le WT et SOD1 chez l'EOM	101
Tableau 5.1	Enrichissement des processus, fonctions et composantes intracellulaires des 635 protéines qui sont augmentés dans le EOM WT versus EDL WT (p-value < 0.0001; GOrilla)..	150
Tableau 5.2	Enrichissement des processus, fonctions et composantes intracellulaires des 59 protéines qui sont augmentés dans le EDL WT versus EOM WT (p-value < 0.01; GOrilla).....	154
Tableau 5.3	Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 504 protéines qui sont augmentés dans le EOM WT versus EDL WT et SOD1 (protéines utilisées : p-value < 0.01; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla).	159
Tableau 5.4	Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 32 protéines qui sont augmentés dans le EDL WT versus EOM WT et SOD1 (protéines utilisées : p-value < 0.01; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla).....	161

Tableau 5.5	Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 231 protéines qui sont exclusivement différentes entre le WT et SOD1 chez l'EDL (protéines utilisées : p-value < 0.05; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla).	164
Tableau 5.6	Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 207 protéines qui sont différentes entre le WT et SOD1 chez l'EDL ainsi que différente entre l'EDL et l'EOM chez le WT et chez le SOD1 (protéines utilisées : p-value < 0.05; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla).	165

Liste des figures

Figure 1.1	Gènes répertoriés dans la SLA	6
Figure 1.2	Mécanismes pathophysiologiques proposés dans la maladie de la SLA	11
Figure 1.3	Anatomie générale des muscles extraoculaires.	25
Figure 1.4	Innervation des muscles extraoculaires.	27
Figure 1.5	Schéma comparatif des caractéristiques générales des motoneurones et unités motrices des motoneurones spinaux versus des motoneurones oculomoteurs.....	29
Figure 1.6	Organisation des JNMs dans les muscles extraoculaires.	31
Figure 1.7	Représentation de la jonction neuromusculaire.	39
Figure 1.8	Le rôle des CSPs durant les processus de réparations des JNMs.....	48
Figure 1.9	Mécanisme potentiel conférant résistance des JNMs des EOMs dans la SLA.	55
Figure 3.1	Morphologie non atteinte des JNMs dans les muscles extraoculaires au stade symptomatique tardif de la SLA.....	70
Figure 3.2	Sensibilité des CSPs des JNMs à l'ATP dans les muscles extraoculaires au stade présymptomatique (P380) de la SLA	75
Figure 3.3	Sensibilité des CSPs des JNMs à la muscarine dans les muscles extraoculaires au stade présymptomatique (P380) de la SLA.....	76
Figure 3.4	Design expérimental permettant la comparaison d'expression protéique dans les muscles extraoculaires et EDL dans l'ALS.....	78
Figure 3.5	Description exhaustive des protéines extraites.....	79
Figure 3.6	Protéines impliquées dans la SLA retrouvées dans la protéomique.....	81
Figure 3.7	Les différences du protéome entre l'EOM et l'EDL dans la SLA	83
Figure 3.8	Exemple de figure et de tableau utilisés pour l'analyse protéomique.	84
Figure 3.9	Profile d'expression protéique différentielle entre l'EOM et l'EDL chez le WT ..	86
Figure 3.10	Profile d'expression des protéines différentielles entre l'EOM et l'EDL chez le WT et chez le SOD1	92
Figure 3.11	Expression différentielle protéique de l'EOM et l'EDL dans la SLA	96
Figure 3.12	Profile d'expression de l'EDL dans la SLA.....	99
Figure 3.13	Profile d'expression de l'EOM dans la SLA.....	103

Liste des sigles et abréviations

ACh : Acétylcholine
ADN : Acide déoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
CSM : Cellule de Schwann myélinisante
CSP : Cellule de Schwann périssynaptique
C9ORF72 : « Chromosome 9 open reading frame 72 »
EMF: Électromyogramme
EOM : muscle extraoculaire « extraocular muscle»
EAAT2: « Excitatory amino acid transporter 2 »
FF: Rapide fatigable (« Fast fatigable »)
FR : Rapide résistante à la fatigue (« Fast-fatigue-resistant»)
FTD : Démence fronto-temporale (« Fronto-temporal dementia »)
FUS : « Fused in liposarcoma »
JNM : Jonction neuromusculaire
mAChR : Récepteur muscarinique à l'acétylcholine
nAChR : Récepteur nicotique à l'acétylcholine
SLA : Sclérose latérale amyotrophique
SLAf : Sclérose latérale amyotrophique familiale
SLAs: Sclérose latérale amyotrophique sporadique
SNC : Système nerveux centrale
SNP : Système nerveux périphérique
SOD1 : Cu/Zn Superoxyde dismutase 1
TAD-43: « Tar-DNA binding protein 43 »
UM : unité motrice

Remerciements

Dans un premier temps, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Richard Robitaille pour cette fantastique opportunité qui m'a permis d'investiguer et de contribuer dans le domaine de la neuroscience ainsi qu'au sein de la communauté de la SLA. Dr Robitaille a non seulement su me guider et m'épauler tout au long de ma maîtrise en neuroscience, mais m'a transmis sa passion pour la recherche et les cellules gliales. L'attitude positive et optimiste du Dr Robitaille a permis d'établir un environnement agréable et stimulant que j'ai grandement apprécié.

Dans un second temps, je veux remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire dans lequel j'ai eu l'opportunité de partager plusieurs discussions scientifiques constructives et éducatives, mais plus importantes, avec lequel j'ai pu développer une réelle chimie et créer d'inoubliable souvenir. Je tiens à remercier particulièrement les membres du Team ALS ainsi que Joanne Vallée et Dre « Duchesse » Arbour qui ont non seulement participer activement à ma formation, mais qui m'ont aidé tout au long de mon parcours en assurant le bon déroulement de mes expériences, à la résolution des défis techniques rencontrés et qui m'ont poussé à développer mon esprit critique et à être un meilleur scientifique. Je remercie les membres du « Team ALS » Elsa Tremblay, Sandrine Marchand, Frederic Fiore, et l'alumni Eric Martineau ainsi que tous les membres du laboratoire, dont Anthony Bosson, Chloé Lamontagne et les anciens membres, dont Sébastien Barbat, Alexandre St-Pierre See et Ayman Moustaine, avec lesquels j'ai partagé mon quotidien durant toutes ces années.

Je veux également remercier quelques amies qui sont non seulement des mentors scientifiques pour moi, mais qui sont désormais des membres intégraux de ma famille: Caroline Favron-Godbout, Cindy Audiger et Hadjara Sidibé. Merci pour votre écoute, pour l'aide et pour vos conseils apportés autour d'un café ou d'une boisson moins caféinée...

Finalement, je désire remercier mes amis, les différents membres de ma famille, dont ma mère Manon Fortin, mon père Sylvain Provost, ma sœur Isabel Provost, ainsi que mon compagnon de vie Giovanni Dimas pour m'avoir encouragé et surtout supporté tout au long de mon parcours. Votre amour et votre support ont été de réelles sources d'inspiration et de motivation qui m'a poussé à me surpasser.

Chapitre 1 - Introduction

1.1 Préambule

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative touchant spécifiquement les motoneurones dont aucun traitement curatif n'existe à ce jour. Cette maladie affecte les patients et leurs proches de manière foudroyante : une paralysie progressive des muscles squelettiques emprisonne petit à petit les patients dans leur propre corps jusqu'à une atteinte du diaphragme menant à des détresses respiratoires fatales. De nombreuses études chez les modèles animaux ont permis de mettre en lumière un aspect primordial de cette maladie : l'importance des cellules gliales dans la pathogenèse de la maladie. En passant par les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies présents dans le système nerveux central, tous acquièrent des altérations cellulaires et possèdent un rôle dans la pathogenèse ainsi que dans la progression de la maladie.

Dans la SLA, une atteinte de la jonction neuromusculaire (JNM) est observée avant la mort des motoneurones. Cette synapse tripartite composée de l'élément présynaptique, la terminaison axonale du motoneurone, l'élément postsynaptique, la fibre musculaire et l'élément glial, la cellule de Schwann pérисynaptique (CSP) coordonnent et assurent le contrôle des différents muscles squelettiques. Des altérations synaptiques et morphologiques ainsi que le phénomène de dénervation à la JNM arrivent en amont de la mort des motoneurones. De manière intéressante, une vulnérabilité différentielle au processus de dénervation est observée: contrairement aux muscles squelettiques, les muscles extraoculaires (EOMs) innervés par les motoneurones (MNs) des noyaux oculomoteurs sont plus résistants à cette dénervation. Ainsi, quels sont les mécanismes leur attribuant cette résistance remarquable aux processus de neurodégénération?

Dans la SLA, au niveau des muscles vulnérables, des altérations de la JNM ainsi des CSPs sont observées bien avant la mort des motoneurones. Observe-t-on des phénomènes similaires dans les JNMs des EOMs? Existe-t-il des différences dans l'expression des protéines dans les EOMs permettant ainsi de s'adapter et de maintenir l'intégrité de leur JNM lors des processus de neurodégénération?

1.2 La sclérose latérale amyotrophique

1.2.1 Information générale

1.2.1.1 Historique et information épidémiologique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurologique décrite pour la première fois au 19^e siècle par le neurologue français, Dr Jean-Martin Charcot. Portant à travers le monde différentes appellations, Maladie de Charcot, ou Maladie de Lou Gehrig en hommage au joueur de baseball américain, cette maladie se caractérise par la perte progressive des motoneurones innervant les muscles responsables de la locomotion et de certaines fonctions vitales comme la déglutition et la respiration (Mitchell and Borasio 2007).

Le diagnostic de cette maladie neurodégénérative se fait entre 45 et 60 ans (Mitchell and Borasio 2007). N'ayant actuellement aucun biomarqueur permettant de diagnostiquer spécifiquement cette maladie, les neurologues diagnostiquent la SLA par élimination : en écartant les autres pathologies une à une, augmentant ainsi considérablement le temps de diagnostic. L'incidence est d'environ 1-2 individus sur 100 000, la prévalence est d'environ 6 individus sur 100 000 (Mitchell and Borasio 2007) et les hommes ont plus de chance de développer la maladie que les femmes (1,6 : 1) (Mitchell and Borasio 2007). La progression de la maladie varie d'un individu à l'autre alors qu'en moyenne, les patients décèdent après 2-3 ans suivant le diagnostic dû à une atteinte du diaphragme causant ainsi une incapacité à maintenir les fonctions respiratoires (Mitchell and Borasio 2007).

1.2.1.2 Diagnostic et outils utilisés

Le diagnostic de la SLA se base sur les critères El Escorial. Révisés en 2010 par la Fédération mondiale de Neurologie (WFN, anglais : World Federation of Neurology), ces critères stipulent que cette maladie se caractérise par la perte progressive des motoneurones supérieurs et inférieurs dans le cortex moteur, le tronc cérébral ou de la corne ventrale de la moelle épinière. Une atteinte des motoneurones supérieurs induit une spasticité et une hyperexcitabilité tandis qu'une atteinte des motoneurones inférieurs induit une fasciculation, un affaiblissement et une atrophie musculaire (Traynor, Codd et al. 2000, Lenglet and Camdessanche 2017). En clinique, selon la ou les régions touchées, la présentation des premiers symptômes est habituellement focalisée à un membre spécifique puis la progression de la maladie cause une paralysie progressive.

À l'heure actuelle, aucun biomarqueur existant ne permet un diagnostic spécifique de la maladie. Cependant, plusieurs outils et tests sont utilisés pour décortiquer ce processus ainsi que pour évaluer la progression de la maladie. Les cliniciens peuvent utiliser l'électromyographie (EMG) afin d'enregistrer l'activité musculaire. Lors d'un EMG anormal, on peut observer une activité électrique spontanée due au processus de dénervation en cours (Lenglet and Camdessanche 2017). Également, le clinicien peut exécuter un deuxième test, soit l'évaluation de la conductance neuronale qui permet de mesurer l'habileté du nerf à transmettre efficacement un signal électrique. Lors de la stimulation des motoneurones par l'application d'une impulsion électrique cutanée, on observe une diminution du CMAP (anglais : compound muscle action potential), soit l'amplitude de contraction du muscle cible dû à une diminution de l'activation musculaire (Lenglet and Camdessanche 2017).

Afin d'évaluer la progression de la maladie, plusieurs outils sont disponibles afin d'examiner les atteintes motrices et les capacités respiratoires. L'ALSFRS (anglais : *Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale*) permet d'avoir une évaluation de la progression de la maladie en évaluant l'atteinte des différentes fonctions motrices (Rooney, Burke et al. 2017). Durant ce test, les cliniciens évaluent les patients selon leur capacité à effectuer certaines fonctions motrices durant leur quotidien. Ils évaluent les atteintes bulbaires en observant la parole, la salivation et la capacité à avaler. Ils évaluent les habiletés motrices plus fines telle la capacité d'écrire, d'utiliser des ustensiles, la locomotion, la capacité à monter ou descendre des escaliers ainsi que la capacité respiratoire maximale. Tous ces tests permettent entre autres d'évaluer la progression de la maladie, mais sont également primordiaux dans la mise en place de commodité et de service pour le bien-être des patients.

1.2.2 Les différentes présentations de la sclérose latérale amyotrophique

La principale caractéristique de la SLA est la dégénération des motoneurones. Malgré tout, plusieurs éléments appuient la notion que la SLA est une maladie à présentation hétérogène possédant un éventail de présentation clinique distinctive (Mitchell and Borasio 2007). D'un patient à l'autre, on peut noter des différences dans l'âge du diagnostic, dans le niveau de la présentation des symptômes lors du diagnostic ainsi qu'au niveau de la vitesse de progression de la maladie. Certains vont présenter des symptômes qui sous-entendent une atteinte bulbaire tandis que d'autre une atteinte spinale. Même parmi les patients souffrant d'une atteinte similaire, certains

peuvent différer au niveau de l'atteinte du type de motoneurone (inférieur et supérieur) ainsi que des muscles touchés (proximaux et distaux). Finalement, une atteinte des fonctions cognitives due à une atteinte du lobe frontotemporal peut être observée et semble être dépendante de la mutation acquise : cet aspect sera discuté dans les sections subséquentes. En ce sens, bien que dans tous les cas, les patients souffrant de SLA partagent cette neurodégénération des motoneurones, la présentation clinique peut grandement différer d'un individu à l'autre et peut être séparée en quelques groupes.

1.2.2.1 Les atteintes spinales

Plus du deux tiers des patients vont se présenter en clinique, lors du commencement de leur maladie, avec un affaiblissement musculaire non douloureux et asymétrique d'un de leur membre inférieur ou supérieur (Brown and Al-Chalabi 2017). Identifiée comme la forme spinale, elle se traduit par une atteinte des motoneurones supérieurs du cortex moteur ou des motoneurones inférieurs de la moelle épinière. Lors du commencement de la maladie, les atteintes sont souvent focalisées (distales ou proximales) et unilatérales. Cependant, une paralysie progressive et bilatérale des membres supérieurs et inférieurs va être observée lors du décours de la maladie.

Lors d'une atteinte des motoneurones supérieurs, soit les motoneurones corticaux faisant synapse avec la moelle épinière, on observe une spasticité musculaire ainsi que la réapparition des réflexes de Babinski : l'extension du gros orteil suite à une stimulation cutanée de la borne externe du pied. Lors d'une atteinte des motoneurones inférieurs, soit les motoneurones partant de la moelle épinière jusqu'aux cibles musculaires, une diminution de la force musculaire, une atrophie ainsi qu'une fasciculation, soit l'activité spontanée, individuelle et asynchrone d'une ou de plusieurs fibres musculaires sont observés.

1.2.2.2 Les atteintes bulbaires

Observée chez environ 20 % des patients et plus présente chez les femmes, la forme bulbaire se présente habituellement par des symptômes affectant les muscles faciaux et ceux responsables de la parole et la déglutition (Talbot, Malek et al. 2016). Lors d'une atteinte des motoneurones supérieurs, on observe un discours ralenti, l'apparition du réflexe palmo-mentonnier (contraction de la houppe du menton suite à la stimulation de la base du pouce) ainsi que l'exagération du réflexe massétérin (fermeture de la bouche suite à la percussion du menton).

Une atteinte au niveau des motoneurones inférieurs, soit ceux partant directement du tronc cérébral vers les muscles faciaux, va causer une faiblesse de la musculature faciale ainsi qu'une fasciculation et une atrophie de la langue. Également, on observe une dysarthrie, en d'autres mots, une difficulté de l'articulation de la parole, une dysphagie, soit une difficulté d'avaler, une difficulté dans l'élévation du palais, une hypersalivation ainsi que, dans certains cas, une atteinte pseudobulbaire menant à des pleurs et des rires incontrôlables (Talbot, Malek et al. 2016).

Les patients avec un début bulbaire ont un moins bon pronostic puisque seulement 3 % des patients survivent plus de deux ans suivant le diagnostic de la maladie dû entre autres à l'implication du noyau des motoneurones phrénique qui serait impliqué dans la dysfonction respiratoire (Pinto, Pinto et al. 2007).

1.2.2.3 Les atteintes des lobes frontotemporales

Décrite initialement comme une maladie touchant uniquement les motoneurones et n'ayant aucune atteinte cognitive, il est désormais accepté que la SLA et la démence frontotemporale (DFT) sont deux maladies d'un même spectre partageant des caractéristiques pathophysiologiques communes (Jiang and Ravits 2019). En clinique, 50% des patients atteints de la SLA vont développer des atteintes cognitives telles que des changements de personnalité, des comportements anormaux, des dysfonctions de langage ainsi que des déficits de mémoires (Ng, Rademakers et al. 2015). Ces atteintes cognitives seraient reliées à certaines mutations spécifiques du gène TARDBP ainsi que de C9ORF72 : ces éléments seront discutés dans les sections suivantes.

1.2.3 Les principales mutations répertoriées et les mécanismes de toxicités

Décrite initialement par Charcot comme une maladie non héréditaire, la SLA n'a été reconnue comme une maladie dont des facteurs génétiques peuvent être transmis et responsable du développement de la maladie que depuis les années 50 à la suite des travaux de Kurland et Mulder rapportant le premier cas familial de SLA (SLAf) (Kurland and Mulder 1955). De nos jours, 10 % des cas de SLA sont reliés à un facteur héréditaire tandis que 90 % des cas sont dû à une apparition sporadique (SLAs) aléatoire au sein de la communauté (Rowland and Shneider 2001). Comme illustré dans la figure suivante (Figure 1.1B), depuis la toute première découverte dans les années 90, une panoplie de mutations génétiques ont été répertoriées. Désormais, il est possible d'expliquer respectivement 11 % et 68 % des cas sporadiques et familiaux de la SLA dus à des

implications des gènes SOD1, TARDBP ainsi que C9orf72 (Figure 1.1A) (Renton, Chio et al. 2014). Dans la section subséquente, les différents mécanismes pathophysiologiques ainsi que les mutations et leurs mécanismes potentiels y participant seront abordés.

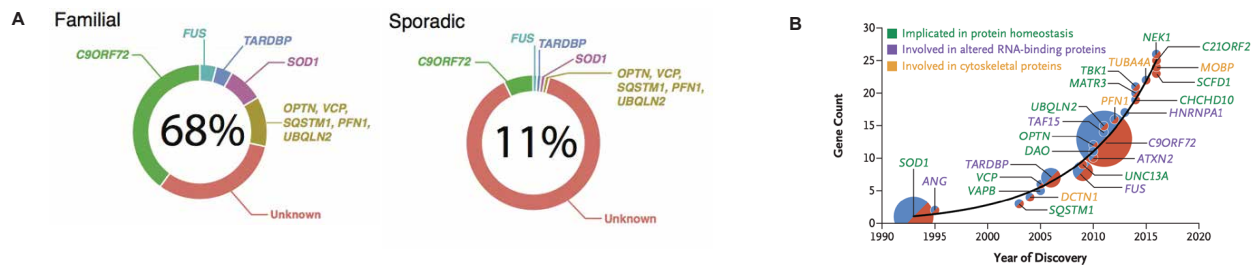


Figure 1.1 Gènes répertoriés dans la SLA
 (A) Principaux gènes causant les cas familial (gauche) et sporadique (droite) de la SLA. Adapté de Renton et al. (2014). Droits obtenus de Springer-Nature et Copyright Clearance Center. Autorisation de traduction n'a pas été obtenu par Springer-Nature. (B) L'ensemble des gènes répertorié dans les cas sporadiques et familiaux dans la SLA. Les cercles bleus indiquent les gènes retrouvés dans les cas familiaux, les cercles rouges dans les cas sporadiques et ceux contenant les deux couleurs sont associés à la fois dans les cas sporadiques et familiaux. La grosseur de chaque cercle est proportionnelle à la quantité répertoriée dans les cas familiaux. Adapté de Brown et al. (2017). Droits obtenus de Copyright Massachusetts Medical Society

1.2.3.1 TARDBP

Le gène TARDBP encode pour une protéine de la famille des nhRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) nommés TDP-43 (Wang, Wang et al. 2004). Une mutation de ce gène est retrouvée chez 1% des cas sporadiques et 4% des cas familiaux de la SLA (Renton, Chio et al. 2014). De manière surprenante, dans un petit nombre de neurones, on retrouve des agrégats cytosoliques de TDP-43 dans plus de 90 % des cortex moteurs et la moelle épinière post-mortem de patients atteints de SLA (Arai, Hasegawa et al. 2006, Neumann, Sampathu et al. 2006) devenant ainsi une signature de la maladie (Ling, Polymenidou et al. 2013, Tan, Ke et al. 2017). La protéine TDP-43 possède les motifs RRM1 et RRM2 (*RNA recognition motif 1 – 2*) permettant de reconnaître et d'interagir avec plus de 6300 ARNs différents (Polymenidou, Lagier-Tourenne et al. 2011) ainsi qu'avec l'ADN simple et double brins (Kuo, Chiang et al. 2014). TDP-43 est primordial pour la survie cellulaire et est impliquée dans le métabolisme des ARNs. Plusieurs processus biologiques telle la modulation de la transcription, la maturation des pré-ARNm, l'épissage, le transport d'ARN ainsi que dans la traduction de protéine sont régulés par cette protéine. TDP-43 peut moduler l'expression de différentes protéines due à son rôle dans l'épissage, à son interaction

avec d'autres protéines liant l'ARN (*RNA-binding protein*) (Buratti and Baralle 2001), ainsi qu'à son interaction avec des microARN (Kang, Liu et al. 2015). TDP-43 est également important pour la formation des granules de stress, soit des granules cytosoliques contenant de l'ARN et des protéines essentielles pour le métabolisme d'ARN afin de les protéger suite à un stress cellulaire.

1.2.3.2 C9ORF72

C9orf72 est l'abréviation pour *chromosome 9 open reading frame 72*. En 2011, la découverte de l'expansion d'une séquence d'hexanucléotique répétitive (GGGGCC) de C9orf72 est retrouvée dans 40 % des SLAf et 5-10 % des SLAs (DeJesus-Hernandez, Mackenzie et al. 2011). C9orf72 est une région générant trois isoformes d'ARN, dont le deuxième est exprimé de manière élevée dans le système nerveux central (SNC) (Rizzu, Blauwendraat et al. 2016). Les récentes recherches ainsi que des analyses bio-informatiques ont permis de déterminer la fonction de cet isoforme : C9orf72 agit comme un facteur échangeur de guanine (GEF anglais : guanine exchange factor) qui interagit avec les différentes protéines Rab. Ces protéines Rab seraient importantes pour trois fonctions : les processus d'autophagie, la formation des lysosomes (Sullivan, Zhou et al. 2016, Webster, Smith et al. 2016) ainsi que la formation des granules de stress (Maharjan, Künzli et al. 2017).

1.2.3.3 SOD1

La première mutation découverte dans la SLA en 1993 est l'enzyme nommée SOD1, une Cu-Zn superoxyde dismutase, rapportée pour la première fois dans des cas familiaux de SLA par Rosen et al. 1993 (Rosen, Siddique et al. 1993). Désormais, une mutation de cette enzyme a été reportée chez 20% des patients SLAf ainsi que 2% de SLAs (Boillée, Vande Velde et al. 2006). Les recherches subséquentes ont permis l'identification de plus de 170 mutations sur les 5 exons du polypeptide de 153 acides aminés du gène : par exemple, SOD1^{A4V} (remplacement d'une alanine en position 4 par une valine), SOD1^{G37R} ou SOD1^{G85R} (remplacement d'une guanine par une arginine) ainsi que SOD1^{G93A} (remplacement d'une guanine par une alanine) (Taylor, Brown et al. 2016). Cette enzyme est localisée principalement dans le cytoplasme (Crapo, Oury et al. 1992) ainsi que dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Field, Furukawa et al. 2003). Trouvée sous forme d'homodimère, chaque sous-unité contient un cuivre et un ion de zinc et les deux sous-unités sont liées via une liaison disulfure (Parge, Hallewell et al. 1992). Sa fonction est de catalyser la conversion des réactifs oxydés produits par la mitochondrie en peroxyde d'hydrogène ou en

oxygène. Une mutation de SOD1 induit un mauvais repliement de cette protéine la rendant insoluble semblable à des agrégats (Bruijn, Houseweart et al. 1998). Quelques études suggèrent que les patients possédant une mutation identique vont avoir un décours de la maladie similaire contrairement aux patients possédant des mutations distinctes (Radunović and Leigh 1996, Andersen, Nilsson et al. 1997). Il a été également reporté qu'une forte habileté à créer des agrégats de la protéine SOD1 prédirait une sévérité et une rapidité de progression de la SLA plus importante (Wang, Johnson et al. 2008, Prudencio, Hart et al. 2009).

1.2.3.4 Les modèles pathophysiologiques

En passant par les cultures cellulaires neuronales ou les cellules gliales créées à partir de cellules souches épidermiques de patients jusqu'à la génération de modèles animaux transgéniques, ces différents modèles expérimentaux ont permis d'investiguer plusieurs mécanismes pathophysiologiques dans SLA. Les modèles animaux transgéniques vont être générés à partir d'organisme dont le *C. elegans*, le poisson zébré ainsi que des modèles murins tels la souris ou le rat. La majorité des modèles sont générés en insérant un ou plusieurs gènes humains mutés répertoriés causant la SLA (Figure 1.1). La surexpression des mutations est primordiale pour observer des altérations cellulaires et/ou phénotypes moteurs qui sont spécifiques à la mutation insérée. Les principaux modèles utilisés contiennent une mutation du gène SOD1, du gène TARDP, du gène FUS ou une extension de C9orf72. Ceci a permis de découvrir de nombreux mécanismes pathophysiologiques qui seront abordés dans la section subséquente (section 1.2.3.5).

Les modèles SOD1 sont caractérisés par une neurodégénération progressive des motoneurones et présentent de nombreuses similitudes avec les altérations retrouvées chez les patients : on note entre autres une atteinte des motoneurones supérieurs et inférieurs, une dénervation des jonctions neuromusculaires (JNMs) (Pun, Santos et al. 2006, Miller, Sturm et al. 2016), une altération mitochondriale (Higgins, Jung et al. 2003, Liu, Lillo et al. 2004), une agrégation de la protéine mutée (Bruijn, Houseweart et al. 1998, Watanabe, Dykes-Hoberg et al. 2001) ainsi qu'une activation microgliale (Boillée, Yamanaka et al. 2006, Henkel, Beers et al. 2006). Les différents modèles SOD1 se distinguent par plusieurs éléments, soit le début de l'apparition des symptômes ainsi que la vitesse de progression de la maladie.

Le premier modèle généré, soit le modèle SOD1^{G93A} (guanine remplacée par une alanine) (Gurney, Pu et al. 1994), est caractérisé par un déclenchement de la maladie précoce (90 jours) ainsi qu'une progression très rapide menant à la mort vers 130 jours due à son taux d'expression du transgène très élevé (20 fois plus élevé que retrouvé chez l'être humain normalement). Dans les expériences présentées dans ce mémoire, un autre modèle est utilisé : le modèle SOD1^{G37R} (guanine remplacée par une arginine). Ce modèle est caractérisé par un déclenchement plus tardif de la maladie ainsi qu'une progression plus lente (Wong, Pardo et al. 1995). De manière générale, les symptômes se déclenchent vers 450 jours, une perte de poids d'environ 10% ainsi que l'apparition de déficit moteur sont observées à partir de 480 jours et finalement, les souris survivent jusqu'à 550 jours (Tremblay, Martineau et al. 2017).

1.2.3.5 Les mécanismes pathophysiologiques de la SLA

Malgré toutes les recherches effectuées depuis la découverte du premier gène muté, aucun consensus sur le ou les mécanismes exacts impliqués dans la génération de la toxicité n'a été déterminé. De manière générale, les protéines mutées retrouvées chez les patients souffrant de SLA vont soit perdre la fonction physiologique et/ou acquérir une nouvelle fonction qui sera toxique selon le gène impliqué. Par exemple, suite à une mutation du gène SOD1, Turner et Talbot ont démontré que la majorité des protéines SOD1 mutées n'acquièrent pas le bon repliement (Turner and Talbot 2008). Malgré que, dans certains cas, la présence d'une mutation n'affecte pas la fonction de cette enzyme (hSOD1^{G93A} (Gurney, Pu et al. 1994), hSOD1^{G37R} (Wong, Pardo et al. 1995)) tandis que certaines mutations induisent son inactivation (hSOD1^{G85R} (Bruijn, Becher et al. 1997), hSOD1^{Quad} (Wang, Slunt et al. 2003)), tous ont mené aux phénotypes observés. Ceci appuie ainsi l'acquisition d'une nouvelle fonction toxique due au nouveau repliement de la protéine SOD1.

Dans les modèles TDP-43 ou C9orf72, un consensus sur la perte de fonction ou le gain de toxicité n'est toujours pas établi. D'une part, la perte des fonctions nucléaires de TDP-43 ainsi que l'acquisition de nouvelle fonction toxique de ces agrégats au niveau cytoplasmique ont été reportées (Ling, Polymenidou et al. 2013). Dans les modèles contenant l'expansion pathologique retrouvée dans C9orf72, une diminution de la protéine associée est observée (haploinsuffisance) ainsi que l'acquisition de mécanismes toxiques dû à la présence de protéines à répétitions dipeptidiques (PRD) (Ash, Bieniek et al. 2013, Schipper, Raaphorst et al. 2016) et d'ARN Foci (une extension d'ARN répétitive adoptant une structure secondaire inappropriée) (Cooper-Knock,

Higginbottom et al. 2015) sont reportés. En ce sens, il n'est toujours pas clair si la pathophysiologie engendrée par une mutation de TDP43 ou l'expansion de C9orf72 sont dues à une perte de leur fonction ou l'acquisition d'une nouvelle fonction toxique.

Ainsi, selon la mutation retrouvée, différents mécanismes cellulaires semblent affectés spécifiquement aux fonctions initiales du gène. Malgré tout, plusieurs altérations convergent vers des mécanismes récurrents : homéostasie protéique et métabolisme d'ARN, dysfonction du transport axonal, des composantes du cytosquelette et des vésicules synaptiques ainsi que l'excitotoxicité glutamatergique (Figure 1.2). Les mécanismes présents principalement dans les motoneurones seront présentés dans les sections suivantes (1.2.3.5.1 à 1.2.3.5.4) tandis que les mécanismes en lien avec les cellules gliales seront présentés dans une section subséquente (1.2.4).

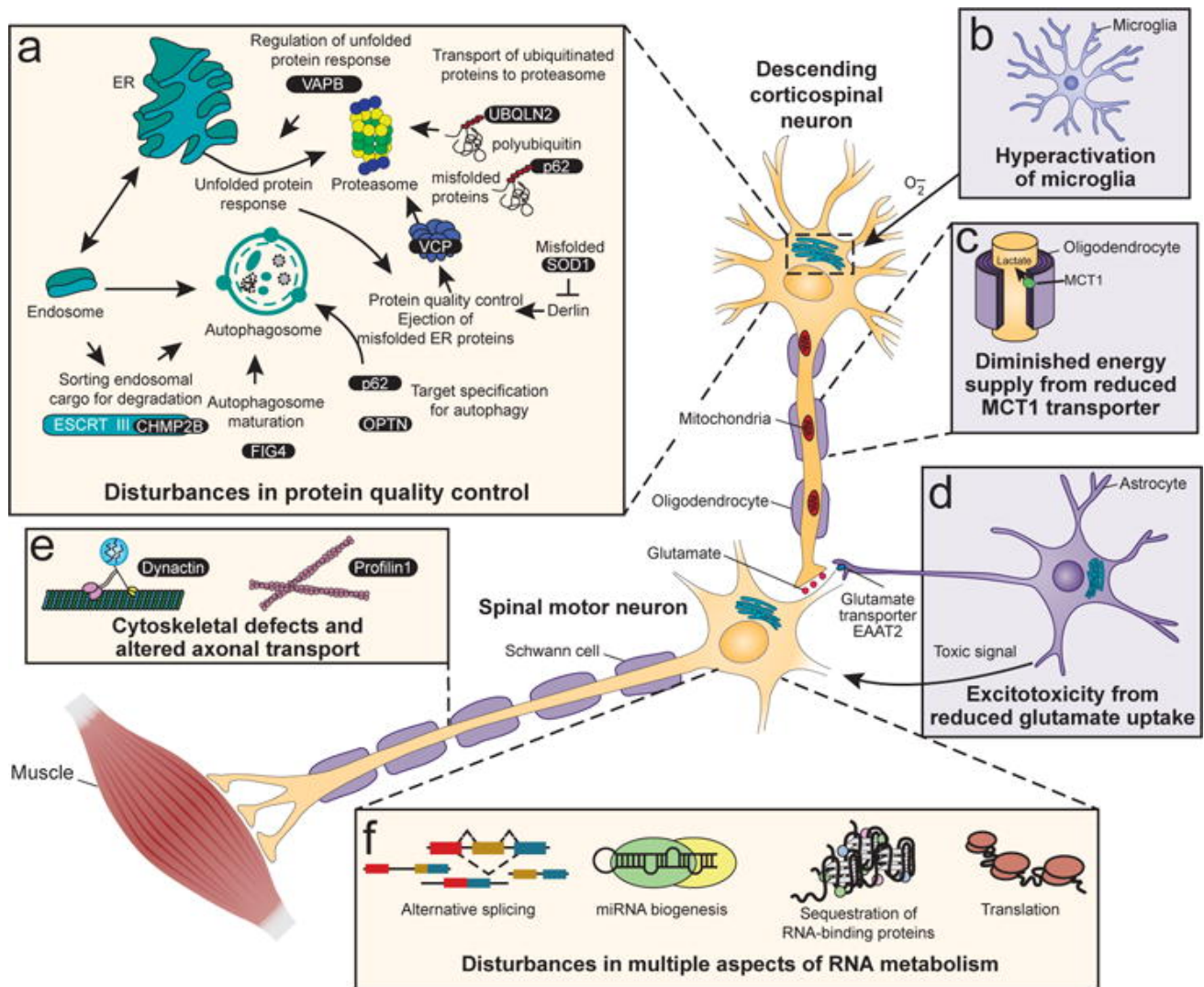


Figure 1.2 Mécanismes pathophysiologiques proposés dans la maladie de la SLA

Schéma illustrant les mécanismes pathophysiologiques récurrents dans la SLA. (A) Dérèglement du contrôle de qualité des protéines (F) du métabolisme d'ARN (E) ainsi qu'une altération du transport axonal est reportée dans les motoneurones. (B) Une hyperactivation des microglies (C) une diminution de l'apport énergétique (D) ainsi qu'une excitotoxicité glutamatergique sont également observées. Tiré de Taylor et al. (2016). Droits obtenus de Springer-Nature et Copyright Clearance Center. Autorisation de traduction n'a pas été obtenu par Springer-Nature.

1.2.3.5.1 L'excitotoxicité glutamatergique

L'une des premières hypothèses de toxicité émise en lien avec la mutation de SOD1 est l'atteinte des motoneurones due à une excitotoxicité (Figure 1.2D). Le phénomène d'excitotoxicité se produit lors d'une stimulation excessive par le glutamate permettant une entrée massive de calcium à l'intérieur du motoneurone. Chez les patients une hyperexcitabilité corticale des motoneurones supérieurs a été rapportée (Vucic, Nicholson et al. 2008, Menon, Kiernan et al. 2015, Taetzsch, Tenga et al. 2017). Ceci mènerait à la relâche excessive de glutamate au niveau des motoneurones inférieurs, permettant une entrée massive d'ions calcium activant les cascades moléculaires responsables de la mort cellulaire telle l'activation subséquente de la caspase 1 et de la caspase 3 responsable de l'apoptose cellulaire (Pasinelli, Houseweart et al. 2000). Plusieurs arguments favorisent cette hypothèse. D'une part les récepteurs glutamatergiques AMPA des motoneurones possèdent une plus faible expression de la sous-unité GluR2, une sous-unité importante pour l'imperméabilité calcique (Laslo, Lipski et al. 2001), ce qui les rendrait plus sensibles à l'excitotoxicité. Également, d'autres éléments sembleraient exacerber ce mécanisme. D'une part, la diminution du transporteur glutamatergique EAAT2 dans les astrocytes est observée, favorisant ainsi l'accumulation du glutamate dans la fente synaptique (Rothstein, Martin et al. 1992). D'une autre part, l'absence des protéines importantes pour la gestion du calcium telle la parvalbumine et la calbindine D28K dans les motoneurones des patients atteints d'ALS favoriserait l'exagération de ce phénomène (Alexianu, Ho et al. 1994).

Le riluzole (Rilutek®), tout premier traitement pour la SLA approuvé en 1995 par la UFDA (anglais : US Food and Drug Administration) diminue l'excitotoxicité glutamatergique des motoneurones corticaux en bloquant les canaux sodiques voltage-dépendants ainsi qu'en bloquant le flux calcique des canaux NMDA (Benoit and Escande 1991, Malgouris, Daniel et al. 1994). Malheureusement, ce traitement n'est pas curatif et ne permet que de prolonger de 35 % la durée de la survie des patients (2-3 mois) (Bensimon, Lacomblez et al. 1994). Un second traitement en étude clinique présentement est le pimozide. Ce dernier est un neuroleptique (Pinder, Brogden et al. 1976) utilisé actuellement en psychiatrie (Shapiro, Shapiro et al. 1987) qui agit sur les conductances calciques et potassiques influençant l'excitabilité neuronale. L'utilisation de ce traitement a démontré une amélioration de la transmission synaptique ainsi qu'une stabilisation de la jonction neuromusculaire chez les modèles animaux ainsi qu'un certain maintien de la fonction motrice chez les patients (Patten, Aggad et al. 2017).

1.2.3.5.2 Dérèglement du contrôle qualité des protéines

Un second processus intracellulaire altéré est le mécanisme de contrôle de qualité des protéines assurant leur repliement et leur dégradation. Cette hypothèse a été proposée suite à l'observation de l'accumulation des protéines SOD1 mal repliée sur les membranes du réticulum endoplasmique (RE) (Kikuchi, Almer et al. 2006). Au niveau du réticulum endoplasmique, on note l'activation de chaperone (BiP), l'expression de protéine induite lors de stress cellulaire (IRE1, PWEK, ATF6) (Kikuchi, Almer et al. 2006) ainsi que l'inhibition de l'ERAD (anglais : *endoplasmic reticulum associated degradation*) et de derlin-1 empêchant la translocation des protéines vers le cytosol pour leur dégradation subséquente (Nishitoh, Kadowaki et al. 2008). (Figure 1.2A)

Un second mécanisme altéré est le repliement adéquat des protéines par les chaperones moléculaires. Initialement, il a été possible de noter une inhibition des HSP (anglais : *heat shock protein*) dans plusieurs modèles murins SOD1 (Tummala, Jung et al. 2005). Cependant, des études subséquentes ont obtenu des résultats contradictoires : une augmentation des HSP dans les motoneurones et les cellules gliales ainsi qu'aucun effet bénéfique sur la survie des motoneurones suite à l'augmentation de HSP70 dans des modèles murins ont été observé (Liu, Shinobu et al. 2005, Wang, Sharma et al. 2009). En ce sens, le maintien de la fonction des chaperones ne semble pas être suffisant pour contrevenir aux mauvais repliements protéiques observés.

Un troisième mécanisme qui semble altéré dans la SLA est le protéosome qui dégrade les protéines possédant une chaîne d'ubiquitines. Chez les patients ainsi que dans les modèles murins, les agrégats contenant cette ubiquitine (Wang, Slunt et al. 2003) ont mené à une hypothèse de surcharge du protéosome menant ainsi à une déficience des mécanismes de dégradations. Ceci a également été observé dans d'autres mutations répertoriées dans la SLA dont Ubiquilin-2 (Deng et al., 2011), p62/Sequestosome-1 (Fecto et al., 2011; Teyssou et al., 2013) ainsi que Valosin-containing protein (Johnson, Mandrioli et al. 2010) qui sont importants pour la fonction du protéosome (Taylor et al. 2016) (Figure 1.2A).

Dans les modèles TDP-43, l'acquisition de nouvelles fonctions toxiques de ces agrégats dans le cytoplasme est observée (Ling, Polymenidou et al. 2013). Une perturbation du processus d'endocytose, des processus responsables de la dégradation des protéines par le protéosome, des processus d'autophagie ainsi que les mécanismes responsables de l'assemblage des granules de

stress sont reportés (Kang, Liu et al. 2015). Finalement, une altération de processus d'autophagie et de la formation de l'autophagosome ont été répertoriées dans quelques mutations impliquées dans l'ALS dont Optineurine (Maruyama, Morino et al. 2010) ainsi que dans le cas de C9orf72 (Shi, Lin et al. 2018). En ce sens, l'altération et le dérèglement des différentes étapes de gestions de la qualité des protéines dans la SLA sont un élément commun présent dans plusieurs mutations identifiées.

1.2.3.5.3 Altération du transport axonal, désorganisation cytosquelette et du trafic des vésicules synaptiques

Une troisième altération observée dans la SLA concerne une désorganisation du cytosquelette axonale ainsi que le transport de cargo dans l'axone. Dans un premier temps, il a été possible d'observer chez des patients (Kawamura, Dyck et al. 1981, Hirano, Donnenfeld et al. 1984) et dans les modèles murins (Wong, Pardo et al. 1995, Bruijn, Houseweart et al. 1998, Kong and Xu 1998) une accumulation des neurofilaments dès les stades précoces (Kong and Xu 1998) (Figure 1.2E). Non seulement une désorganisation du cytosquelette axonal est observée, mais des études ont démontré qu'à un stade présymptomatique de la maladie, on observe une diminution du transport antérograde (Williamson and Cleveland 1999), du transport rétrograde (Murakami, Nagano et al. 2001, Perlson, Jeong et al. 2009) ainsi qu'une augmentation du transport des protéines et autres facteurs de stress de manière rétrograde (Perlson, Jeong et al. 2009). Cette altération dans le transport axonal a été également observée dans les modèles TDP-43 dont une mutation cause un déficit du transport des granules d'ARNm importantes pour la synthèse de protéine synaptique (Fallini, Bassell et al. 2012, Alami, Smith et al. 2014). Finalement, une altération du transport des vésicules synaptiques ainsi qu'une déplétion des synapses distales (Pun, Santos et al. 2006) sont également observées. Une section exclusive sur les altérations à cette synapse, la jonction neuromusculaire (JNM) dans la SLA sera abordée plus bas (section 1.5)

1.2.3.5.4 Dérèglement du métabolisme d'ARN

Un troisième mécanisme altéré est le dérèglement du métabolisme d'ARN. Cette hypothèse est apparue suite à la découverte de la mutation TDP-43 ainsi que FUS (anglais : Fused In Sarcoma) qui sont toutes les deux des protéines importantes pour plusieurs mécanismes en lien avec le métabolisme de l'ARN et dont des agrégats cytosoliques sont reportés (Taylor, Brown et al. 2016) (Figure 1.2F). Ces protéines assurent non seulement la traduction de l'ADN, l'épissage alternatif

ainsi que la formation d'ARNm, mais elles modulent également la transcription génique en assurant, entre autres la formation de microARN, en interagissant directement avec des protéines importantes pour l'expression génique ainsi qu'en induisant la formation de granule de stress (Lagier-Tourenne, Polymenidou et al. 2010, Taylor, Brown et al. 2016).

L'expansion pathologique retrouvée dans C9orf72 acquiert également de nouvelles fonctions toxiques dues à la présence de protéines à répétitions dipeptidiques (PRD) (Ash, Bieniek et al. 2013, Schipper, Raaphorst et al. 2016) ainsi que suite à la séquestration d'ARNm au sein d'ARN Foci. L'ARN Foci, soit un ARNm qui acquière une structure secondaire complexe et qui est en mesure de séquestrer les protéines liant l'ARN, empêche le bon fonctionnement des protéines séquestrées menant ainsi à un dérèglement du métabolisme d'ARN (Kovanda, Zalar et al. 2015, Taylor, Brown et al. 2016). Néanmoins, l'absence de PRD dans les motoneurones inférieurs (Davidson, Barker et al. 2014) et l'absence de corrélation entre le nombre de PRD (Mackenzie, Frick et al. 2015) et des ARN Foci avec la neurodégénération dans la SLA et DFT (Mizielinska, Lashley et al. 2013, DeJesus-Hernandez, Finch et al. 2017) indiquent ainsi que d'autres mécanismes seraient responsables de la mort des motoneurones observée dans la SLA. (Mizielinska, Lashley et al. 2013, DeJesus-Hernandez, Finch et al. 2017).

1.2.3.5.5 Mécanismes de toxicité spécifique retrouvés dans les modèles SOD1: les dysfonctions mitochondriales et le stress oxydatifs

Un élément distinctif entre les modèles SOD1 animaux utilisés est le niveau d'activation de l'enzyme SOD1. Entre autres, plusieurs modèles transgéniques vont posséder une mutation dont l'activité enzymatique est maintenue tel hSOD1^{G93A} (Gurney, Pu et al. 1994), hSOD1^{G37R} (Wong, Pardo et al. 1995) ou dont l'enzyme demeure inactive tel hSOD1^{G85R} (Bruijn, Becher et al. 1997), hSOD1^{Quad} (Wang, Slunt et al. 2003). Or, dans tous ces modèles animaux, malgré la différence d'activité enzymatique, la dégénération des motoneurones est observée. Cet aspect suggère que les mécanismes toxiques observés seraient davantage dû à l'acquisition d'une nouvelle fonction toxique plutôt que due à la perte de son activité enzymatique.

Dès la moitié du 19^e siècle, des études histopathologiques chez des patients SLA sporadiques et familiaux ont pu relater des altérations mitochondriales communes : des mitochondries dilatées avec présence de vacuole ainsi qu'un cristae désorganisé dans les motoneurones et les cellules musculaires (Afifi, Aleu et al. 1966, Hirano, Donnemfeld et al. 1984).

Des études subséquentes ont démontré la présence de dépôt de SOD1 sur la face cytosolique de la membrane externe des mitochondries au niveau axonal des motoneurones dès les stades présymptomatiques (Liu, Lillo et al. 2004, Vande Velde, Garcia et al. 2004, Vande Velde, Miller et al. 2008). L'altération mitochondriale ne causerait pas de changement dans le métabolisme de l'ATP dû aux résultats contradictoires observés (Mattiuzzi, D'Aurelio et al. 2002, Damiano, Starkov et al. 2006), mais induit une diminution du tamponnage calcique (Damiano, Starkov et al. 2006), l'activation des cascades proapoptotiques ainsi que la génération des anions superoxydes (Pasinelli, Belford et al. 2004, Pickles, Semmler et al. 2016)

Finalement, un dernier mécanisme proposé est la production excessive de superoxyde. Ce mécanisme a été évoqué suite à l'association de SOD1 avec Rac1, une GTPase qui active la sous-unité Nox2 de la NADPH oxydase produisant ainsi dans l'espace extracellulaire des réactifs superoxydes (Harraz, Marden et al. 2008). Un second traitement approuvé pour la SLA, l'edaravone (Radicava®) agit comme un agent antioxydant prévenant le stress oxydatif induisant la mort des motoneurones (Cruz 2018). À la suite des études de phase 3, l'edaravone prolonge la survie des patients, réduit les pertes de fonctions motrices lorsqu'il est administré dans un stade précoce de la maladie (Yoshino 2019). Cependant, tout comme le riluzole, l'edaravone n'est malheureusement pas un traitement curatif de la SLA et ce traitement n'est efficace que pour les patients ayant une progression plus lente de la maladie (décours temporel supérieur à deux ans).

En ce sens, bien que tous ces mécanismes semblent participer de près ou de loin à la pathogenèse de la SLA, aucun consensus n'indique que ces mécanismes précis sont les éléments initiateurs de la maladie ou tout simplement une conséquence subséquente. Bien que la SLA est caractérisée par la dégénérescence des motoneurones, plusieurs de ces mécanismes vont affecter à la fois les cellules non neuronales avoisinantes telles les cellules gliales.

1.2.4 Mort cellulaire non-autonome

En se basant sur la panoplie de mécanismes impliqués dans cette pathologie, plusieurs recherches ont eu recours à des modèles animaux avec une mutation généralisée. Mais quel groupe cellulaire est-il vraiment important pour l'apparition des symptômes?

Des études clefs ont permis de mettre en lumière l'importance des cellules environnantes non neuronales dans la génération ainsi que la progression de la SLA. Dans le début des années 2000, deux études publiées par Pramatarova et al. (2001) ainsi que Lino et al. (2002) ont démontré

que l'expression unique de SOD1 muté dans les cellules neuronales n'étaient pas suffisant pour causer la mort des motoneurones. Une troisième étude phare publiée par Clément et al. (2003) a utilisé différentes lignées de souris avec une expression génique aléatoire en mosaïque. Dans cette lignée de chimère, l'expression de la protéine SOD1 va donc aléatoirement être exprimée dans les motoneurones et/ou dans les cellules gliales environnantes. Ceci a permis de renforcer l'importance des cellules gliales dans la pathogenèse de la SLA puisque les motoneurones n'exprimant pas la protéine SOD1 mutée ont malgré tout dégénéré lorsqu'ils étaient dans un environnement dont les cellules avoisinantes exprimaient la mutation. Également, une augmentation de la survie des motoneurones étaient observées lorsque ces cellules avoisinantes non neuronales n'exprimaient pas la protéine SOD1 mutée. En ce sens, les cellules non neuronales avoisinantes contribuent à la mort des motoneurones dans la SLA. Cependant, quelle cellule non neuronale est importante à ce phénomène observé?

Il a été possible de manipuler de manière efficace l'expression spécifique de la protéine SOD1 dans différents compartiments types cellulaires et d'évaluer leur rôle dans le développement de la SLA. Entre autres, l'utilisation du système Cre-Lox a permis d'inhiber spécifiquement l'expression de SOD1 au niveau de différentes populations cellulaires. De manière intéressante, l'inhibition dans les motoneurones uniquement via cette technique (Boillée, Yamanaka et al. 2006) ou via l'utilisation d'un lentivirus (Ralph, Radcliffe et al. 2005) a retardé le début du déclenchement de la maladie, cependant, n'a pas affecté la progression de celle-ci. En ce sens, un concept clé émerge de ces études. La mort des motoneurones dans la SLA nécessite également l'implication d'autres types de cellules : la mort cellulaire non-autonome (non-cell autonomy). Dans la section qui suit, le rôle dans le déclenchement ainsi que la progression de la SLA des cellules gliales et de différents types cellulaires seront abordés.

1.2.4.1 Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes dans le SNC. Elles exécutent diverses fonctions essentielles au bon fonctionnement des neurones. À la synapse, les astrocytes effectuent non seulement le recyclage des neurotransmetteurs, mais également régulent la transmission synaptique (Araque, Carmignoto et al. 2014). Les astrocytes possèdent des extensions nommées pieds astrocytaires faisant un contact direct avec le système vasculaire cérébrale. Les astrocytes contribuent à la barrière hématoencéphalique et assurent son bon fonctionnement. Les

astrocytes sont importants également pour assurer la balance ionique ainsi que pour le support métabolique essentiel au bon fonctionnement des neurones dans le SNC. Dans le contexte de maladies neurodégénératives, les astrocytes peuvent adapter leur fonctionnement. Ces astrocytes réactifs peuvent adopter un phénotype pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire en sécrétant des facteurs spécifiques modulant l'activation microgliale.

Cependant, dans le contexte de la SLA, quels sont le rôle et l'implication des astrocytes? L'inhibition de l'expression de SOD1 mutée spécifiquement et exclusivement dans les astrocytes via le système Cre-Lox a ralenti la vitesse de progression de la maladie (Yamanaka, Chun et al. 2008). En ce sens, les astrocytes semblent exercer un effet toxique sur les motoneurones qui affecte la progression de la SLA. Cette implication dans la progression de la maladie peut être associée à plusieurs facteurs. D'une part, les astrocytes peuvent exaspérer l'excitotoxicité glutamatergique observée. En effet, une diminution de l'expression des transporteurs aux glutamates EAAT2 astrocytaire au niveau du cortex moteur et de la moelle épinière des patients atteints de SLA (Rothstein, Van Kammen et al. 1995) ainsi que dans les modèles murins (Bruijn, Becher et al. 1997, Howland, Liu et al. 2002) a été observé. Cette diminution de l'expression serait due à la caspase 3 qui clive le transporteur EAAT2 (Boston-Howes, Gibb et al. 2006) ainsi qu'à l'inhibition de la libération de KBBP (anglais : kappa B-motif binding phosphoprotein) observée lors de la perte de connectivité observée entre deux synapses et qui est un facteur important pour la transcription du transporteur EAAT2 (Yang, Gozen et al. 2009).

D'autres phénomènes observés au niveau des astrocytes pourraient contribuer à la neurodégénération dans la SLA. D'une part, une diminution de la relâche du lactate est observée (Ferraiuolo, Higginbottom et al. 2011). Ce dernier est un élément indispensable au support métabolique des neurones et la diminution de cette relâche favoriserait ainsi la mort des motoneurones. Également, l'activation de quelques cascades moléculaires par les astrocytes serait délétère au motoneurone. En effet, les astrocytes via la libération de « tumor-necrosis factor alpha » (TNF α) causeraient la mort des motoneurones (Kia et al., 2018). Des toxicités similaires des astrocytes ont été observées dans des modèles murins TDP-43 (Ditsworth, Maldonado et al. 2017), FUS (Scekic-Zahirovic, Oussini et al. 2017) ainsi qu'en co-culture cellulaire avec des motoneurones et des astrocytes issus de patients diagnostiqués de la SLA (Haidet-Phillips, Hester et al. 2011).

1.2.4.2 Les microglies

Les microglies sont les cellules immunitaires qui résident dans le SNC. Elles vont exercer plusieurs fonctions dont plusieurs similaires aux autres cellules immunitaires. Entre autres, elles vont exercer un rôle dans l'inflammation ainsi que dans les différentes étapes menant à l'élimination et à la phagocytose des pathogènes. Les microglies vont exercer leurs fonctions sous deux formes : la forme pro-inflammatoire (M1) ainsi que la forme anti-inflammatoire (M2). Selon les récepteurs et les cytokines que les microglies expriment et sécrètent, elles vont être en mesure de maintenir l'homéostasie neuronale. De plus, les microglies ont des rôles spécifiques dans le système nerveux central. Durant la neurogenèse, les microglies sont importantes à la maturation des synapses en participant à l'élimination des synapses surnuméraires (Schafer, Lehrman et al. 2012). Également, tout comme les astrocytes, les microglies sont en mesure de réguler et de moduler l'activité synaptique (Pfeiffer, Avignone et al. 2016). Ainsi, les cellules microgliales possèdent-elles un rôle protecteur ou néfaste dans le déclenchement ainsi que la progression de la SLA?

D'une part, dans les tissus post-mortem des patients, on reporte une augmentation de marqueur de microglie activée (Kawamata, Akiyama et al. 1992), dont l'augmentation corrèle avec les atteintes des motoneurones (Turner, Cagnin et al. 2004). Dans les modèles murins, l'excision spécifique du gène SOD1 dans les cellules microgliales a triplé la survie en diminuant de manière remarquable la progression de la maladie sans toutefois affecter l'apparition de la maladie (Boillée, Yamanaka et al. 2006). Des répercussions similaires ont été également reproduites en procédant à une transplantation de moelle osseuse afin de remplacer les cellules microgliales exprimant le SOD1 mutée par des microglies ne comprenant pas la mutation (Beers, Henkel et al. 2006). En première vue, les cellules microgliales semblent exercer un effet délétère et participer activement aux atteintes des motoneurones dans les modèles murins ainsi que chez les patients.

Plusieurs mécanismes semblent contribuer à l'effet toxique exercé par les microglies dans la progression de la maladie. Durant les stades symptomatiques de la SLA, les microglies acquièrent un profil pro-inflammatoire délétère: une augmentation des marqueurs de présentation antigène (CD11c, ICAM-1, CD86) (Henkel, Engelhardt et al. 2004, Turner, Cagnin et al. 2004, Henkel, Beers et al. 2006, Corcia, Tauber et al. 2012) ainsi qu'une augmentation de la relâche des cytokines et des chemokines pro-inflammatoires sont observées (Henkel, Engelhardt et al. 2004,

Henkel, Beers et al. 2006, Corcia, Tauber et al. 2012). Également, les microglies vont favoriser la dégénération des motoneurones en sécrétant d' O_2^- (Beers, Henkel et al. 2006, Taylor, Brown et al. 2016) ainsi qu'en activant les voies NF- κ B. (Frakes, Ferraiuolo et al. 2014). De plus, ces cytokines sont en mesure d'exacerber l'excitotoxicité glutamatergique en libérant d'une part du glutamate (Mesci, Zaidi et al. 2015) ainsi qu'en inhibant directement le transporteur glutamatergique EAAT2 dans les astrocytes (Pickering, Cumiskey et al. 2005, Tilleux and Hermans 2007).

Malgré tout, un aspect intéressant des microglies dans la SLA a émergé suite à l'inefficacité de la modulation de la réactivité microgliale comme cible thérapeutique. Les microglies ont une capacité d'exercer leur rôle selon deux phénotypes : pro- ou anti-inflammatoire. D'une part, l'inhibition NF- κ B microgliale, qui est responsable de la réponse pro-inflammatoire, a diminué la neurodégénération et prolongé la survie des souris (Frakes, Ferraiuolo et al. 2014) tandis qu'une réduction des microglies réactives n'a eu aucun effet (Gowing, Philips et al. 2008). D'une autre part, l'inhibition d'IL-10 et de son récepteur, une cytokine anti-inflammatoire importante, a accéléré le déclenchement de la maladie. En ce sens, les microglies, par leur capacité a exercé un rôle anti-inflammatoire et pro-inflammatoire semble avoir un rôle biphasique dans la maladie. Durant les phases présymptomatiques, leur capacité à générer un environnement anti-inflammatoire est neuroprotecteur puisque l'inhibition des cytokines anti-inflammatoire précipite le déclenchement de la maladie (Gravel, Beland et al. 2016). Durant la progression de la SLA, les microglies acquièrent un phénotype pro-inflammatoire, favorisent la neurodégénération des motoneurones et, via leur interaction directe avec les astrocytes, induiraient leur phénotype pro-inflammatoire (astrocyte réactif) observé : exacerbant ainsi le processus de toxicité (Liddelw, Guttenplan et al. 2017).

1.2.4.3 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont les cellules gliales dans le SNC responsable de la myélinisation des axones. Ces cellules ont également une autre fonction très importante : elles assurent l'accès du lactate aux axones : la source d'énergie nécessaire pour assurer la transmission axonale. Ceci est possible via les transports de lactate MCT1 présents sur la gaine de myéline ainsi que les transporteurs MCT2 présents au niveau neuronal (Lee, Morrison et al. 2012).

De manière intéressante, malgré que la SLA est décrite comme une maladie ne possédant aucune atteinte de la myéline, il est possible d'observer plusieurs altérations dans les oligodendrocytes. Entre autres, une perte de fonction des oligodendrocytes due à une diminution de MCT1 et de MBP (protéine de myéline) chez les modèles murins et chez les patients ont été observées (Lee, Morrison et al. 2012). Des dommages aux cellules progénitrices d'oligodendrocytes (OPC) ainsi qu'une dégénération des oligodendrocyte apparaît avant la mort des motoneurones (Kang, Li et al. 2013). Ces phénomènes sont expliqués par une augmentation de prolifération des cellules progénitrices dans la moelle épinière (Kang, Fukaya et al. 2010) précédant le déclenchement de la SLA qui mènerait aux phénomènes relatés précédemment, soit à la dégénération des oligodendrocytes ainsi qu'à l'atteinte au niveau de leur transporteur MCT1 et des protéines importantes pour la myélinisation (Lee, Morrison et al. 2012, Kang, Li et al. 2013). Ainsi, les oligodendrocytes vont contribuer au déclenchement de la SLA puisque l'excision du gène SOD1 muté via Cre-Lox dans les cellules précurseurs des oligodendrocytes a eu pour effet de retarder l'apparition de la maladie sans affecter la progression une fois la maladie déclenchée.

1.2.4.4 Les cellules de Schwann

Les cellules de Schwann sont un groupe de cellules gliales se trouvant au niveau du SNP. Il existe différents types de cellules de Schwann : les cellules de Schwann myélinisantes ainsi que les cellules de Schwann périssynaptiques. Les cellules de Schwann myélinisantes, tout comme les oligodendrocytes, sont responsables de la myélinisation des axones ainsi que du transport de métabolites. Les cellules de Schwann périssynaptiques sont des cellules gliales ne produisant aucune myéline se trouvant à la JNM. Une section complète sur cette cellule gliale se trouve subséquentement (section 1.4).

Dans la SLA, le rôle des cellules de Schwann myélinisantes est encore méconnu. Plusieurs études effectuées ont mené à des résultats contradictoires. L'excision du gène SOD1 sous le

promoteur des cellules de Schwann P0 via le système Cre-Lox a mené à l'accélération (Lobsiger, Boillee et al. 2009) ou au ralentissement (Wang, Pytel et al. 2012) de la progression de la SLA. L'une des différences principales dans ces deux études est l'activité enzymatique dans les modèles utilisés : Lobsiger et al. (2009) ont utilisé un modèle dont l'activité de SOD1 est préservée tandis que Wang et al. (2012) ont utilisé une superoxyde dismutase possédant une mutation inactivant l'enzyme. En ce sens, l'activité enzymatique de SOD1 serait neuroprotectrice. L'inhibition de l'enzyme muté, mais qui conserve tout de même son activité enzymatique accélère la progression de la SLA (Lobsiger, Boillee et al. 2009) tandis que l'inhibition de SOD1 muté inactivant l'enzyme aurait un effet protecteur (Wang, Pytel et al. 2012). Une étude subséquente a augmenté spécifiquement dans les cellules de Schwann l'expression de SOD1^{G93A} une mutation maintenant l'activité enzymatique menant ainsi à un léger ralentissement de la progression de la SLA (Turner, Ackerley et al. 2010). Malgré tout, les études énoncées précédemment utilisent différents modèles et mènent à des conclusions distinctes. L'implication de SOD1 dans les cellules de Schwann nécessite davantage d'investigation pour déterminer si SOD1 est neuroprotecteur ou contribue aux phénotypes observés dans la SLA.

1.2.4.5 Les cellules musculaires

Comme décrit précédemment, la SLA est caractérisée non seulement par la mort des motoneurones qui se traduit par une diminution de la force de contraction musculaire, mais également par une atrophie musculaire. En ce sens, existe-t-il des mécanismes pathogéniques au sein même des myocytes qui favoriseraient l'apparition de la maladie? Suite à plusieurs manipulations géniques, les résultats obtenus sont contradictoires. D'une part, l'inhibition spécifique de la mutation SOD1 dans plus de 50% des cellules musculaires via le système Cre-Lox ou en inhibant grâce à l'utilisation d'ARN interférant n'ont eu aucun effet sur le déroulement temporel de la maladie (Miller, Kim et al. 2006, Towne, Raoul et al. 2008). Suite à l'induction spécifique de la transcription du gène SOD1 muté dans les myocytes, des dommages musculaires tels qu'une atrophie musculaire, une diminution de la force musculaire ainsi que des dysfonctions mitochondriales ont été induites sans générer toutefois une dénervation neuromusculaire (Dobrowolny, Aucello et al. 2008).

D'un autre côté, d'autres études ont obtenu des résultats contradictoires. Une surexpression de SOD1 mutée dans les muscles a mené à la neurodégénération des motoneurones (Wong and

Martin 2010) et les perturbations métaboliques énergétiques dans les myocytes semblent être suffisantes pour induire la dénervation des JNMs (Dupuis, Gonzalez de Aguilar et al. 2009). Également, les cellules musculaires sont en mesure de sécréter des facteurs trophiques, dont « *FGF-binding protein 1* », une chaperonne qui est en mesure de ralentir la dénervation des motoneurones dans la SLA (Taetzsch, Tenga et al. 2017). Somme toute, d'autres recherches sont nécessaires afin de clarifier la réelle contribution des cellules musculaires dans le déclenchement et la progression de la SLA.

1.2.5 Atteinte différentielle de la dénervation

Un phénomène intéressant se produit de manière constante dans toutes les formes d'ALS: le début des symptômes arrive de manière focale, puis progresse petit à petit, et, dans la majorité des cas, engendre une paralysie complète du corps. Certains muscles, comme ceux contrôlant les membres inférieurs ou supérieurs, semblent plus susceptibles à la maladie tandis que d'autres sont affectés plus tardivement, comme dans le cas des muscles oculomoteurs (Nijssen, Comley et al. 2017).

Cette atteinte musculaire différentielle est également présente au niveau des jonctions neuromusculaires. La dénervation des JNMs est un événement qui arrive avant la perte significative des motoneurones dans la moelle épinière (Fischer, Culver et al. 2004). Une étude publiée par Pun et al. (2006) a démontré l'existence d'une vulnérabilité différentielle due à la composition intrinsèque de chaque muscle (Pun, Santos et al. 2006). Chaque muscle est innervé par différents types d'unité motrice et dont certaines seraient plus vulnérables au processus de dénervation que d'autres.

Une contraction musculaire appropriée au moment opportun est permise grâce au contrôle de plusieurs fibres musculaires avec un motoneurone. Dans les muscles squelettiques contrôlant la majorité des membres, un motoneurone peut innerver plusieurs fibres musculaires, mais chaque fibre musculaire est innervée par un seul et unique axone : le tout forme l'unité motrice (UM). De manière générale les UM se distinguent par leur vitesse de contraction, leur force de contraction ainsi que leur résistance à la fatigue. Il existe trois grandes familles d'UM : les unités motrices lentes résistantes à la fatigue (type I), les unités motrices rapide et résistante à la fatigue (type IIa) et les unités motrices rapides sensibles à la fatigue (IIb). Dans la SLA, Pun et al ont démontré que les unités motrices rapides fatigables (FF, anglais : fast-fatigable) seraient plus vulnérable au

processus de dénervation, suivi des unités motrices rapides résistantes à la fatigue (FR, anglais : fast-resistant) et finalement les unités lentes (S, anglais : slow) (Pun, Santos et al. 2006).

De manière intéressante, les muscles oculomoteurs sont composés principalement d'une unité motrice unique : les unités motrices résistantes à la fatigue des muscles oculomoteurs. Cependant, ce type d'UM partage plusieurs similitudes avec les muscles vulnérables. Ainsi, malgré ces ressemblances, quel élément leur procure cette résistance? Dans les prochaines sections, les muscles oculomoteurs ainsi que l'implication des cellules gliales au maintien de la jonction neuromusculaire dans la SLA seront abordés.

1.3 Les muscles oculomoteurs

La vision est l'un des sens les plus importants chez l'être humain. Il nous permet non seulement de contempler une œuvre d'art, mais également, il nous permet de percevoir tout danger imminent pour soi-même. Pour s'y faire, chaque œil est muni d'une musculature complexe coordonnée de manière précise afin d'exercer les différents mouvements permettant d'assurer la production de l'image identique dans la rétine de chaque œil.

1.3.1 Neuroanatomie et physiologie générale des muscles extraoculaires

Chaque œil est muni de six différents muscles oculomoteurs lui permettant ainsi d'être stabilisé, d'effectuer un mouvement rapide telle une saccade, ou d'effectuer un mouvement plus lent comme une poursuite. Il existe deux catégories de muscles extraoculaires, les muscles droits tel le supérieur, le latéral, l'inférieur et le médial ainsi que les muscles obliques supérieurs et inférieurs.

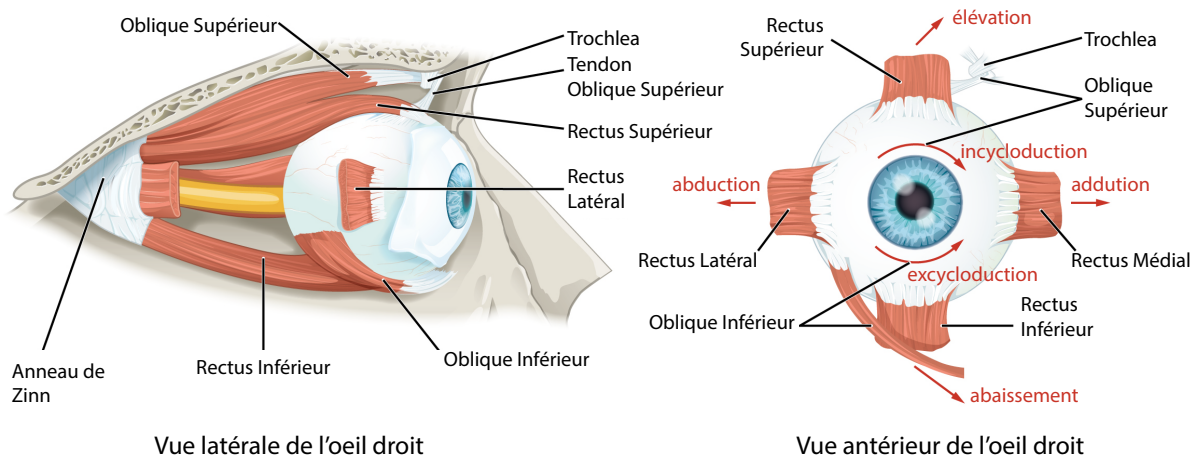


Figure 1.3 Anatomie générale des muscles extraoculaires.

Schéma illustrant les différents muscles extraoculaires. À gauche, une vue latérale de l'œil droit permet de voir les muscles obliques (inférieur et supérieur) et les muscles droits (rectus latéral, inférieur, supérieur) qui sont rattachés à une structure tendineuse nommée l'anneau de Zinn. À droite, une vue antérieure de l'œil droit permet d'observer les différents muscles droits et obliques ainsi que les mouvements engendrés lors de leur contraction respective (flèche rouge). Modifiée de OpenStax College, Anatomy & Physiology, Connexions Web site : <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>. Licence : Creative Commons non transposé (CC BY 3.0)

À l'extrémité de chaque muscle oculomoteur, leur fin tendon s'insère dans la sclère, une structure tendineuse blanchâtre du globe oculaire. Du côté opposé de chaque muscle droit, ces derniers s'attachent à une seconde structure tendineuse, l'anneau de Zinn tandis que les muscles obliques supérieur et inférieur s'attachent à l'os médial de l'orbite. Ces muscles fonctionnent par paire antagoniste : afin d'effectuer le mouvement opportun, certains muscles extraoculaires doivent

se contracter tandis que leurs muscles antagonistes doivent s'inhiber. Pour effectuer des mouvements horizontaux, la coordination des rectus latéral et médial est nécessaire. Pour engendrer des mouvements verticaux ainsi que des mouvements rotatifs autour de l'axe orbital, une coordination plus complexe entre les rectus supérieur et inférieur ainsi que les muscles obliques supérieur et inférieur est nécessaire (Figure 1.4).

L'ensemble de ces mouvements vont permettre d'assurer que la fovéa, soit la région la plus sensible de la rétine, soit toujours enlignée de manière adéquate. Il existe deux catégories de mouvements oculaires: les mouvements engendrés suite à un déplacement de la tête ou les mouvements afin de maintenir une image sur la fovéa. Durant un mouvement rapide de la tête, les différents canaux semi-circulaires du système vestibulaire présent dans l'oreille interne possèdent un système disynaptique au niveau du tronc cérébral qui se connecte spécifiquement aux différents rectus. Ces connections synaptiques permettent de stabiliser le regard sur la cible suite à un mouvement de la tête. La deuxième catégorie de mouvements est ceux induits directement par le système oculomoteur pour maintenir une image sur la fovéa. Cette catégorie comprend trois différents types de mouvements : la vergence, les saccades et la poursuite lente. Une vergence se produit dans les situations dans lesquelles, afin de fixer le regard sur une cible qui s'approche, l'angle oculaire entre chaque œil et l'objet change. La saccade est un mouvement très rapide permettant de diriger notre attention visuelle sur une cible rapidement tandis que la poursuite lente est un réflexe permettant de stabiliser un objet en mouvement sur la fovéa. Ces différents mouvements vont utiliser des voies neuroanatomiques distinctes qui vont inclure non seulement des régions corticales (cortex moteur, cortex pariétal, aire visuelle associative), mais également des régions dans le tronc cérébral (colliculus supérieurs, colliculus inférieurs, formation réticulaire mésencéphalique et paramédiane pontique).

Afin d'effectuer les différents mouvements volontaires ainsi qu'involontaires des yeux, trois noyaux dans des régions sous-corticales assurent la coordination motrice. Principalement, le noyau oculomoteur (CIII) contrôle la majorité des rectus soit le droit supérieur controlatéral, le rectus droit inférieur et médial ipsilatéral ainsi que l'oblique inférieur ipsilatéral. Le noyau trochléaire (CIV) innerve le rectus oblique supérieur controlatéral et le noyau abducens (CVI) innerve le rectus latéral ipsilatéral (Figure 1.5). Également, des projections entre les différents noyaux controlatéraux permettent de coordonner le mouvement des deux yeux. Lors des mouvements horizontaux, le noyau abducens, via les interneurons de l'abducens, projette vers le

noyau oculomoteur controlatéral du rectus médial. Ceci permet ainsi aux deux yeux d'effectuer les mouvements dans la même direction. Également, des connexions entre les noyaux trochléaire et oculomoteur permettent une coordination similaire des mouvements verticaux des différents yeux.

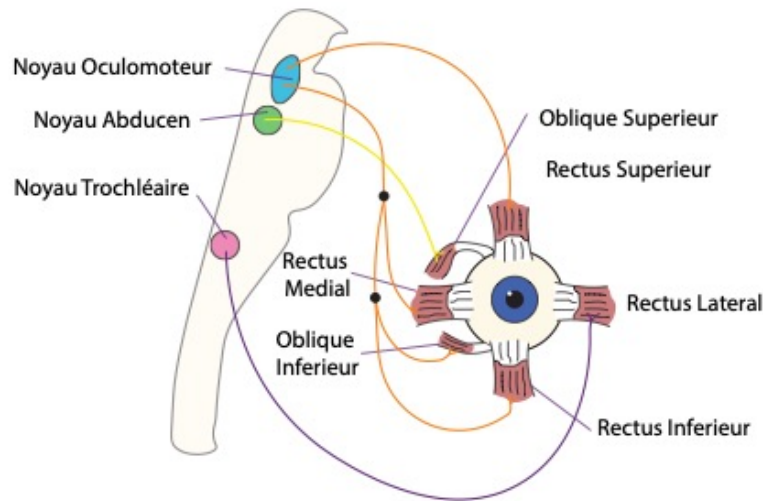


Figure 1.4 Innervation des muscles extraoculaires.

Schéma illustrant les innervations spécifiques des différents muscles extraoculaires. Le noyau oculomoteur (bleu) innerve les rectus supérieur, médial, inférieur et l'oblique inférieur (orange). Le noyau abducen (vert) innerve l'oblique supérieur (jaune) tandis que le noyau trochléaire (rose) innerve le rectus latéral.

1.3.2 Les unités motrices des muscles oculomoteurs

Les unités motrices, qui représentent l'ensemble des fibres musculaires innervées par un seul et unique axone, sont divisées en trois grandes catégories : FF, FR, S. Cependant le portrait des unités motrices des muscles oculomoteurs est beaucoup plus complexe et il est nécessaire de les décrire davantage par leur composition protéique en employant les techniques immunohistochimiques afin d'identifier directement les différentes myosines. Les myosines sont les protéines contractiles musculaires les plus présentes au niveau des muscles squelettiques. Contenant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, elles sont exprimées de manière spécifique selon le type de tissu et selon le stade de développement.

Il existe différentes isoformes de la chaîne lourde de la myosine (CHM), les CHMs rapides (IIa, IIx, IIb, com), les CHMs lentes (I, a-cardiac et lente tonique) et les CHMs développementales (embryonique, fœtale). Dans les muscles oculomoteurs, on retrouve non seulement les myosines classiques tel le type I, type IIa, type IIb, type IIx, mais également des types spécifiques aux muscles oculomoteurs tels les Myh13 et Myh15, une myosine tonique lente, la Myh14, une

myosine cardiaque, Myh6 ainsi que respectivement une myosine embryonnaire Myh3 et néonatal Myh14. Dans les muscles oculomoteurs, ces différentes myosines sont exprimées dans la partie globale et orbitale des six différents muscles (Rossi, Mammucari et al. 2010, Zhou, Liu et al. 2010) et une seule fibre musculaire peut exprimer plusieurs types de CHMs (Zhou, Liu et al. 2011).

1.3.3 Particularités des MN et UM spécifiques aux muscles oculomoteurs

Les motoneurones ainsi que les unités motrices des muscles extraoculaires se distinguent grandement des autres par plusieurs caractéristiques. Dans un premier temps, le soma ainsi que les longueurs de l'arborisation dendritique des EOM sont plus petits que ceux des motoneurones spinaux (Figure 1.6). Contrairement aux autres motoneurones des muscles squelettiques, les MNs des différents muscles extraoculaires déchargent à une fréquence de basale de 100 Hz permettant ainsi de maintenir une certaine tension au globe oculaire et peuvent générer des potentiels d'action jusqu'à une fréquence de 600 Hz lors d'une saccade oculaire (Robinson 1970).

Deux autres aspects distinctifs sont au niveau des unités motrices. D'une part, contrairement à tous les différents types de muscles squelettiques, les fibres musculaires des EOMs sont les seules à pouvoir être polyinnervées, en d'autres mots; les fibres musculaires possèdent plusieurs JNMs (Figure 1.6). Au total, 80% des fibres musculaires des oculomoteurs sont innervées par un seul axone tandis 20% des fibres musculaires possèdent plusieurs innervations (Nijssen, Comley et al. 2017) (Figure 1.6).

D'une autre part, la taille des unités motrices, soit le nombre de fibres motrices innervées par un seul motoneurone, est beaucoup plus petit dans les muscles oculomoteurs : dans le muscle gastrocnémien, un ratio de 1 motoneurone innervant plus de 2000 fibres motrices est observé contrairement aux muscles oculomoteurs, qui possèdent un ratio de 1 : 5 (Figure 1.6) (Nijssen, Comley et al. 2017). Finalement, on observe chez les muscles extraoculaires deux regroupements de récepteurs postsynaptiques distincts : les plaques motrices en grappe ainsi que les plaques motrices en plaque dont chacune possède certaines particularités.

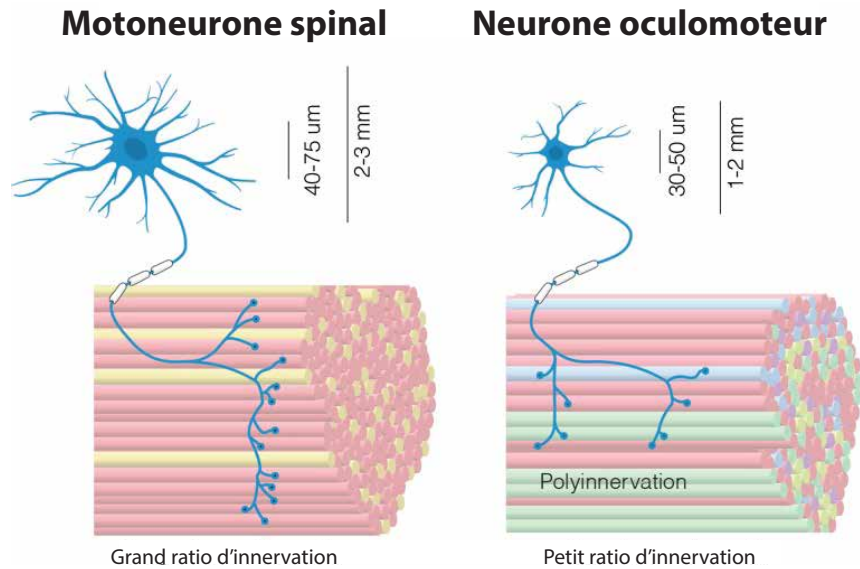


Figure 1.5 Schéma comparatif des caractéristiques générales des motoneurones et unités motrices des motoneurones spinaux versus des motoneurones oculomoteurs.

Un seul motoneurone spinal, comparativement aux motoneurones des oculomoteurs, peut innerver jusqu'à des centaines de fibres musculaires (ratio d'innervation élevé) contrairement au motoneurone des oculomoteurs, qui innervent quelques fibres musculaires (petit ratio d'innervation). Une différence importante entre les motoneurones spinaux et oculomoteurs est la présence de polyinnervation dans les muscles extraoculaires : une fibre motrice peut être innervée par plusieurs axones. Finalement, la taille du soma et celle des dendrites sont plus grandes chez les motoneurones spinaux versus les motoneurones oculomoteurs. Modifié de Nijssen J et al. Acta Neuropathol. 2017. Creative Commons Attribution 4.0 International License

1.3.3.1 Caractéristiques des plaques motrices en grappe

Traditionnellement, les JNMs sont retrouvées en proximité et forment ainsi une plaque qu'on surnomme la plaque motrice. Dans le cas des muscles oculomoteurs, il est possible d'observer deux sections de JNMs : une section en plaque médiale (Figure 1.7 A, C, E) ainsi qu'une section en grappe (Figure 1.7, A, B, D). La section en grappe possède quelques spécificités. Au niveau des JNMs, sur la même fibre multi-innervée (Figure 1.7F, MIF), on observe tout au long de cette dernière plusieurs regroupements de récepteurs nicotiniques qui sont de plus petite taille que celles retrouvées aux regroupements de récepteurs de la partie médiale (Figure 1.7D-F). Ces différents regroupements sur la plaque en grappe peuvent être innervés par le même axone (Figure 1.7F) ou par des axones provenant de JNM de fibres adjacentes (Figure 1.7D) (Zimmermann, Morado-Diaz et al. 2013).

Une autre différence importante entre les plaques motrices des muscles extraoculaires est le couplage excitation-contraction. Traditionnellement, dans les fibres des muscles squelettiques, l'activation des motoneurones mènent automatiquement à la contraction maximale des fibres musculaires innervées. Dans les fibres multi-innervées des EOMs, l'activation de ces JNMs en grappe va générer des petites contractions locales, dont le niveau de contraction va être échelonné selon l'intensité de stimulation qui, contrairement aux autres muscles squelettiques, ne se propage pas tout au long de la fibre musculaire (Zimmermann, Morado-Diaz et al. 2013). Ainsi, plusieurs différences intrinsèques existent entre les muscles squelettiques et les EOMs et ce, non seulement au niveau musculaire, au niveau des motoneurones, mais également au niveau des unités motrices. Cependant, une différence intéressante observée est la résistance particulière des EOMs dans le processus de dénervation observé durant la progression de la SLA.

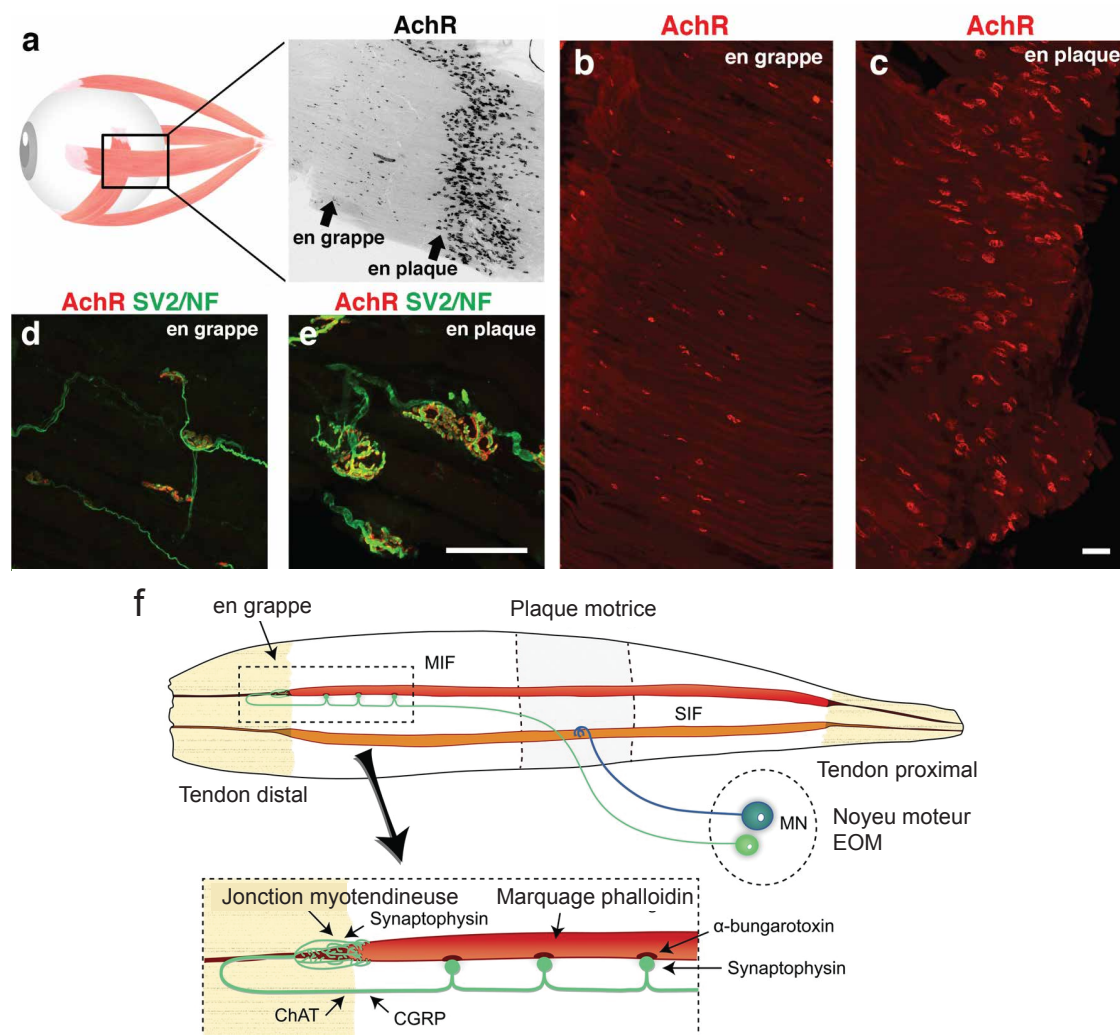


Figure 1.6 Organisation des JNMs dans les muscles extraoculaires.

(A) Marquage des récepteurs nAChR des JNMs des muscles extraoculaires sont organisés en deux bandes : en grappe (B,D) et en plaque (C,E). Les plaques motrices « en grappe » sont de tailles plus petites (B,D) comparativement à la seconde bande « en plaque » qui sont de tailles plus grandes. Marquage des terminaisons présynaptiques (NF / SV2 : vert) permet d'observer de la polyinnervation entre les différentes bandes. Échelles 50 μ m. Modifié de Nijssen J et al. *Acta Neuropathol.* 2017. Creative Commons Attribution 4.0 International License (F) Schéma illustrant les différences d'innervation dans l'EOM. Les MN du noyau extraoculaire innervent les récepteurs se trouvant au niveau de la section en plaque (F « plaque motrice ») ainsi que de manière plus distale (F : « en grappe »). Sur une même fibre polyinnervée (F : MIF), on observe plusieurs petits regroupements de récepteurs nicotiniques (noir, positif à α -bungarotoxine) qui sont innervée par le même axone (vert, axone exprimant la choline acétyltransférase : ChAT) dont se dernier innerve la jonction myotendineuse au niveau du tendon distal. Modifié de Zimmermann, L. et al. *The Journal of Neuroscience.* 2013. Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License (CC BY-NC-SA 3.0).

1.3.4 EOM et leur atteinte tardive dans la SLA

La complétion d'examens ciblant spécifiquement les fonctions motrices des muscles oculomoteurs a permis d'identifier des atteintes dans certaines fonctions des muscles oculomoteurs chez les patients souffrant de la SLA. Les saccades verticales ainsi que la poursuite lente, des mécanismes sous l'influence de structures supranucléaires ainsi que corticales, sont affectés dans 4% des patients ALS (Donaghy, Thurtell et al. 2011). Chez le 10% des patients survivant plus de 10 ans suivant le diagnostic de la SLA, les muscles extraoculaires demeurent majoritairement, malgré tout, cliniquement non-affectés (Nijssen, Comley et al. 2017). Ainsi, existe-t-il des mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer cette atteinte tardive des motoneurones des muscles extraoculaires?

Dans plusieurs modèles murins de la SLA, une très légère perte de motoneurones des noyaux oculomoteurs est observée: très peu de mort de MN, d'inclusion p-62 (indicateur d'autophagie) ou d'agrégats SOD1 mal-repliés dans les noyaux oculomoteurs des modèles SOD1^{G86R} et SOD1^{G93A} sont observés (Nimchinsky, Young et al. 2000). Également, dans un modèle transgénique inductible TDP-43, un second modèle de SLA, les motoneurones des noyaux oculomoteurs sont épargnés, contrairement aux MN des noyaux de l'hypoglosse et spinaux (Spiller, Cheung et al. 2016). Un phénomène similaire est observé chez les patients : malgré que plus de 90% des patients SLA possèdent des inclusions cytoplasmiques de TDP-43 dans les MN corticaux ainsi que spinaux, les MN extraoculaires contiennent rarement ces inclusions (Spiller, Cheung et al. 2016). En ce sens, quelles sont les particularités spécifiques aux MNs des muscles extraoculaires?

1.3.4.1 Les particularités des MNs des noyaux oculomoteurs

Afin d'investiguer les raisons de cette atteinte tardive dans la SLA, l'isolement des motoneurones par la technique de capture par dissection laser a permis d'effectuer plusieurs comparaisons transcriptomiques (ARNm) ainsi que des comparaisons d'expression protéiques spécifiquement dans les MN des noyaux oculomoteurs avec les noyaux des populations de MNs vulnérables. Entre autres, certaines différences dans les mécanismes pouvant diminuer les mécanismes d'excitotoxicité ont été observées. En effet, une augmentation de l'expression des récepteurs GABA_Aα1 (Gabra1) (Hedlund, Karlsson et al. 2010, Comley, Allodi et al. 2015) qui réduit l'excitabilité neuronale ainsi que des protéines calbindin-D28k et parvalbumine (Alexianu,

Ho et al. 1994), qui sont essentielles pour le tamponnage calcique, pourrait leur donner une protection intrinsèque vis-à-vis les mécanismes d'excitotoxicité observés dans la SLA.

D'autres distinctions de profils d'expression d'ARNm sont présentes entre les MN spinaux et les MN des noyaux des muscles extraoculaires et pourraient expliquer la vulnérabilité sélective de certaines populations de motoneurones. Les Semaphorin 3E (Sema3e), gènes essentiels à la croissance axonale sont enrichies dans les noyaux oculomoteurs tandis que les gènes *Natriuretic Peptide Receptor 3* (NPR3), Neurotensin (NTS) ainsi que de Matrix metalloproteinase-9 (MMP9) sont enrichies dans les noyaux des MN spinaux (Nijssen, Comley et al. 2017). La diminution de l'expression de MMP9 a même été en mesure de ralentir le processus de dénervation et de prolonger la survie dans les modèles murins (Kaplan, Spiller et al. 2014). En somme, quelques cibles protéiques différentielles semblent être également essentielles aux maintiens de la JNM et de l'intégrité musculaire entre les muscles vulnérables et résistants. Ainsi, existe-t-il des altérations spécifiques au niveau des muscles extraoculaires?

1.3.4.2 Les atteintes observées dans les muscles extraoculaires

Il a été possible d'observer certaines altérations musculaires dans les muscles extraoculaires. Entre autres, il a été possible d'observer la présence de fibres atrophique et hypertrophique, une augmentation du tissu conjonctif au niveau des muscles ainsi qu'une diminution de l'expression de certaines myosines (MyHCslow tonic et MyHCembryonic) (Ahmadi, Liu et al. 2010). Dans le même ordre d'idée, des laminines telles L α 2 et L β 2, qui sont essentielles au maintien à la membrane basale des muscles squelettiques, sont diminuées et dans certains cas absentes dans les fibres musculaires des EOMs (Liu, Brännström et al. 2011). Le tout suggérant ainsi un certain niveau d'altérations des éléments musculaires dans les EOMs.

Malgré ces changements au niveau protéique, la fonction des EOMs est maintenue de manière remarquable. Quelques changements protéiques semblent favoriser le maintien des fonctions musculaires : l'augmentation de l'expression des protéines Wnts (Wnt1, Wnt3a) (McLoon, Harandi et al. 2014) et le maintien de la laminine L α 4 (Liu, Brännström et al. 2011) qui sont des protéines essentielles pour la formation ainsi que pour le maintien de la JNM. Également, une adaptation observée à des stades présymptomatiques de la SLA a été observée dans des modèles murins. L'augmentation de Neurotrophine-3 et de *Glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF) qui sont des facteurs favorisant la régénération neuronale (Sterne, Coulton et al.

1997) et la survie neuronale (Henderson, Phillips et al. 1994) est spécifique aux EOMs. En ce sens, des adaptations de manière précoce et durant la progression de la SLA favoriseraient le maintien des JNMs des EOMs.

1.3.4.3 Les atteintes gliales dans le tronc cérébral

Finalement, comme démontré précédemment, la SLA est une maladie touchant non seulement les motoneurones, mais également, les cellules gliales environnantes. En ce sens, est-ce que des atteintes différentielles des cellules gliales environnantes pourraient contribuer à la résistance des motoneurones des oculomoteurs? Dans le modèle SOD1^{G93A}, le niveau d'activation astrocytaire et microgliale qui favorise un environnement pro-inflammatoire et neurodégénératif est similaire dans les noyaux vulnérables de l'hypoglosse ainsi que les noyaux résistants oculomoteurs (An, Shi et al. 2014). En ce sens, des atteintes des cellules gliales du SNC similaires ne semblent pas expliquer cette atteinte différentielle. Cependant, qu'en est-il des cellules gliales du SNP et plus précisément des CSPs à la JNM? Sachant que ces dernières sont importantes pour le maintien et la réparation des JNM et que leurs propriétés dans la SLA sont altérées (Arbour, Tremblay et al. 2015), est-ce que cette résistance au processus de dénervation serait due au maintien de la fonction des CSPs à la JNM dans les muscles extraoculaires? Dans la prochaine section, les cellules de Schwann périssynaptiques seront abordées ainsi que de leur rôle dans le maintien et les processus de réparations de la JNM, sans oublier leur contribution dans la SLA.

1.3.5 Les JNMs

La jonction neuromusculaire (JNM) est une synapse chimique tripartite composée d'un élément présynaptique, la terminaison axonale, d'un élément postsynaptique, les récepteurs nicotiques concentrés à la plaque motrice sur les fibres musculaires, ainsi qu'un élément glial, la cellule de Schwann pérисynaptique (CSP). Cette synapse est utilisée comme modèle d'investigation afin de mieux comprendre les divers mécanismes de transmissions synaptiques ainsi que de plasticité durant les stades développementaux, durant le stade adulte ainsi que durant les mécanismes de réparations induits lors de lésion. Dans la section qui suit, une description des différents éléments synaptiques ainsi que des altérations observées dans la SLA sera abordée.

1.3.5.1 L'élément présynaptique : la terminaison axonale

La terminaison axonale est la structure neuronale terminale qui fait synapse avec la fibre musculaire. Le rôle de cet élément synaptique est d'assurer le contrôle de la contraction musculaire par le système nerveux. Pour ce faire, tous les mécanismes assurant la libération des neurotransmetteurs (NTs) sont assurés par la terminaison axonale. En passant de la synthèse des NTs, leur stockage dans les vésicules synaptiques, jusqu'aux mécanismes de leur relâche ainsi que de leur recapture à la fente synaptique. La terminaison axonale est composée d'une zone active (ZA) qui est caractérisée par le regroupement du complexe SNARE, des canaux calciques voltage-dépendant ainsi que des vésicules synaptiques, le tout parfaitement aligné avec l'élément postsynaptique. Dans la ZA, une machinerie protéique nommée le complexe SNARE assure l'amorçage et l'exocytose efficace des vésicules (Wood and Slater 2001). Le complexe SNARE est composé des protéines présentes à la fois sur la membrane plasmique de la terminaison axonale ainsi que sur la membrane des vésicules synaptiques. Les protéines SNAP-25 et syntaxine du complexe SNARE, présentes sur la membrane neuronale, interagissent avec les canaux calciques voltage-dépendant à la terminaison axonale (Jarvis, Barr et al. 2002) (Figure 1.7, Terminaison axonale (vert)). Leur interaction supplémentaire avec la synaptobrevine, protéine présente sur la membrane vésiculaire, permet ainsi d'arrimer les vésicules synaptiques précisément à la zone active en attendant le signal opportun.

L'arrivée du potentiel d'action le long de l'axone va dépolariser la terminaison axonale (Figure 1.7 #1). Chez les mammifères, cette dépolarisation induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type P/Q (Westenbroek, Hoskins et al. 1998) se trouvant dans la ZA

permettant l'entrée massive et circonscrite de calcium (Figure 1.7 #2). Le Ca^{2+} se lie à la synaptotagmine, protéine présente au niveau des vésicules synaptiques, induisant ainsi la fusion avec la membrane plasmique de la vésicule synaptique permettant la libération de leur contenu dans la fente synaptique (Figure 1.7 #3). Un concept clef qui sera discuté plus tard est le principe de libération quantique de NT. Cette libération quantique représente la libération du contenu d'une seule et unique vésicule dans la fente synaptique. Ceci se fait habituellement de manière sporadique.

Dans la terminaison axonale, il existe différents types de vésicules synaptiques : les vésicules claires, ainsi que les vésicules à corps denses. Les vésicules claires à la JNM contiennent les neurotransmetteurs l'ACh et l'ATP (Dale, Feldberg et al. 1936). La synthèse de l'ACh se fait via l'enzyme choline-acétyl-transférase (ChAT) à partir de la choline ainsi que de l'acétyl-CoA. L'ACh est ensuite transférée dans les vésicules synaptiques grâce aux transporteurs vésiculaires de l'ACh (VACHT). Ces transporteurs, via le gradient de proton établi par les pompes à protons présentes dans la membrane des vésicules synaptiques, assurent le déplacement d'ACh à l'encontre de leur gradient chimique. Lorsque le contenu des vésicules claires est relâché, l'ACh est dégradée par l'acétylcholinestérase présente dans la fente synaptique. L'ATP, de son côté, est dégradée en adénosine diphosphate, adénosine monophosphate ainsi qu'en adénosine dans la fente synaptique (Zimmermann 2000). Les vésicules à corps denses, de leur côté, contiennent plusieurs neuromodulateurs telles que la substance P ainsi que *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) (Matteoli, Haimann et al. 1988, Matteoli, Haimann et al. 1990). Elles sont toujours éloignées de la zone active. Leur relâche de la terminaison axonale se produit lors des stimulations répétitives qui mènent à une saturation du système permettant au calcium de dépasser la zone active et d'induire leur relâche (Cohen, Weiss et al. 1978, Whim and Lloyd 1989). Ainsi, les neurotransmetteurs présents dans la fente synaptique vont se lier aux récepteurs présents dans l'élément postsynaptique (figure 3.4 #4) ainsi que dans les récepteurs présents au niveau de la CSP (Figure 1.7 #5). Ces éléments seront discutés dans les sections subséquentes.

1.3.5.2 L'élément postsynaptique : la fibre musculaire

L'élément postsynaptique de cette synapse tripartite est la plaque motrice de la fibre musculaire. Cette dernière acquiert une structure spécifique assurant une efficacité optimale lors de la relâche de neurotransmetteur. Comme illustré dans la figure suivante (Figure 1.7, Fibre musculaire (rose)), on observe la présence de nombreux replis ainsi que de nombreuses crêtes synaptiques. Au sommet de ses replis se trouvent les récepteurs nicotiniques. Dans le creux des replis, au niveau de la crête, se trouve les canaux sodiques voltage-dépendants. Tout comme au niveau de la terminaison axonale, une machinerie protéique permet la spécialisation de l'élément postsynaptique. Notamment, rapsyn est une protéine d'échafaudage spécifique à la JNM qui permet le regroupement des nAChR (Gautam, Noakes et al. 1995). Quelques cascades moléculaires semblent être importantes pour la synthèse et l'agrégation des récepteurs. La neureguline-1 et son récepteur tyrosine-kinase ErbB favorise la synthèse de nAChR (Sanes and Lichtman 2001). L'agrine, qui, suite à sa sécrétion par les terminaisons axonales et par les CSPs, se lie à LRP4 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 4*) se trouvant au niveau postsynaptique. Cette liaison induit la phosphorylation de MuSK (*Muscle Specific Kinase*), une cascade qui est cruciale pour le regroupement des récepteurs nicotiniques (DeChiara, Bowen et al. 1996). Un second élément important est l'enlignement des différents éléments synaptiques. Ceci est possible en partie grâce à LRP4 et aux laminines présentes dans la matrice extracellulaire. Entre autres, LRP4 permet le regroupement des vésicules synaptiques et des protéines à la ZA (Wu, Lu et al. 2012), tandis que la chaîne laminine $\beta 2$, qui interagit avec les canaux calciques voltage dépendant présents à au niveau de la terminaison présynaptique, se lie avec la chaîne intégrine $\beta 1$ de la fibre musculaire (Jacobson, Cote et al. 2001). Ces différents acteurs permettent un alignement des éléments postsynaptiques à la synapse avec l'élément présynaptique assurant ainsi une transmission synaptique efficace.

Suite à la relâche de l'ACh dans la fente synaptique, la liaison de l'ACh aux récepteurs nicotiniques engendre une entrée massive de cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) (Figure 1.7 #4A), induit une forte dépolarisation de la fibre musculaire qui est nommée potentiel de plaque motrice. Lorsque cette dépolarisation est supérieure au seuil des canaux sodiques voltage-dépendant $\text{Nav}1.4$ présent (Yang, Sladky et al. 1991), ceci engendre leur ouverture (Figure 1.7 #4B) et génère un potentiel d'action musculaire postsynaptique. Ce potentiel d'action musculaire va se propager à l'intérieur du myocyte, et induit, lorsqu'il arrive au niveau du réticulum sarcoplasmique, la relâche du Ca^{2+}

suite à l'ouverture des canaux calcique voltage-dépendant du réticulum sarcoplasmique. Le calcium va par la suite se lier à la troponine, lui induisant un changement de conformation permettant ainsi le site de liaison d'actine d'être accessible. Les filaments de myosine présents vont s'y lier et l'hydrolyse de l'ATP en ADP associée sur le filament de myosine permet le déplacement du filament d'actine, induisant ainsi la contraction musculaire (Figure 1.7 #4C). Cette cascade moléculaire menant à la contraction musculaire est interrompue suite à la dégradation rapide de l'ACh par l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) qui dégrade l'ACh en choline et acide acétique.

1.3.5.3 L'élément glial : la cellule de Schwann périssynaptique

Le troisième élément de la JNM est la cellule de Schwann périssynaptique. Suite à la relâche des NTs, l'ACh et l'ATP vont respectivement se lier aux récepteurs métabotropiques muscariniques (M1/M3/M5) et purinergiques (P2Y) (Figure 1.7 #5A) qui vont activer des cascades moléculaires intracellulaires permettant l'activation des récepteurs IP₃R du réticulum endoplasmique (Figure 1.7 #5B) induisant la relâche calcique des réserves intracellulaires (Figure 1.7 #5C). Comme il sera mentionné dans la section subséquente, les CSPs possèdent un rôle très actif dans la JNM. Elles sont non seulement en mesure de détecter et de moduler la transmission synaptique, mais elles sont également importantes durant les processus de maturation et de réparation de la JNM.

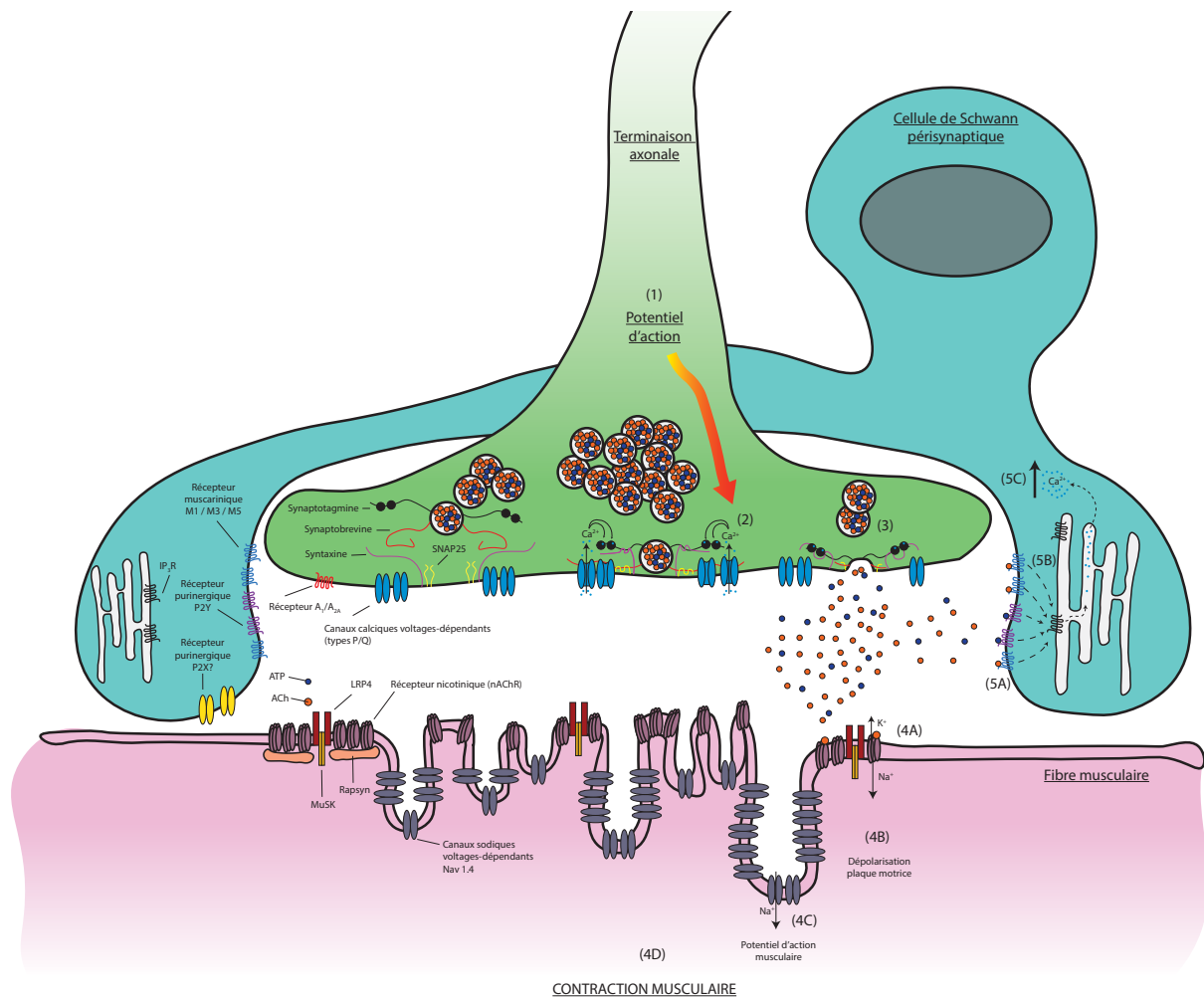


Figure 1.7 Représentation de la jonction neuromusculaire.

Schéma résumé de la JNM et des différents éléments de cette synapse tripartite : fibre musculaire (rose), terminaison axonale (vert), cellules de Schwann périssynaptique (bleu). Au niveau de la terminaison axonale, les vésicules synaptiques sont arrimées au niveau de la zone active grâce au complexe SNARE : les protéines vésiculaires synaptotagmine et synaptobrevine interagissent respectivement avec les protéines syntaxine et SNAP25 situées au niveau de la zone active dans la terminaison axonale. L'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison axonale ouvre les canaux calciques voltages dépendants permettant l'entrée de Ca^{2+} dans la zone active qui se lie au site de liaison calcique de la synaptotagmine, enclenchant la fusion de la vésicule synaptique avec la membrane plasmique de la terminaison axonale. L'ACh (cercle orange) et l'ATP (cercle bleu) dans les vésicules sont libérées dans la fente synaptique et vont activer les récepteurs nicotiniques de la fibre musculaire (4A) et les récepteurs muscariniques et purinergiques de la CSP (5A). Au niveau de la fibre musculaire, les récepteurs nicotiniques (nAChR) sont regroupés via la rapsyn, LRP4 et MuSK. Leur perméabilité aux cations assure que suite à la liaison de l'ACh aux récepteurs, leur activation permet l'entrée massive du sodium (4A) ce qui dépolarise la plaque motrice (4B). Lorsque le seuil des canaux sodiques voltage-dépendants Nav1.4 est atteint, leur ouverture permet l'entrée massive de sodium générant le potentiel d'action musculaire (4C) qui va induire la contraction musculaire (4D). Au niveau de la CSP, l'ACh et l'ATP vont respectivement se lier aux récepteurs métabotropiques muscariniques (M1/M3/M5) et purinergiques (P2Y) (5A) qui vont activer des cascades moléculaires intracellulaires permettant l'activation des récepteurs IP3R du réticulum endoplasmique (5B) induisant la relâche calcique des réserves intracellulaires (5C).

1.4 Les cellules de Schwann Perisynaptiques

Traditionnellement, la communauté scientifique décrivait les fonctions des cellules gliales du SNC comme étant principalement importante dans le soutien aux neurones et au niveau du maintien d'un environnement optimal pour ces derniers en mettant à leur disposition les métabolites ainsi que les facteurs trophiques nécessaires à leur bon fonctionnement (Banker G.A. (1980), Kettenmann and Ransom (1995)). Suite à des travaux dans le SNC et à la JNM, notre perception et notre compréhension du rôle des cellules gliales dans le système nerveux ont changé : les astrocytes ainsi que les CSPs jouent un rôle dynamique à la synapse dû à leur capacité de moduler la communication entre les différents éléments synaptiques (Robitaille 1998, Araque, Parpura et al. 1999). Cette découverte a mené la génération d'une nouvelle perception primordiale dans le domaine des neurosciences : la synapse tripartite. De nombreux travaux publiés subséquemment ont démontré que les astrocytes détectent l'activité synaptique (Shigetomi, Bushong et al. 2013) sont en mesure de relâcher des gliotransmetteurs modulant l'activité synaptique (Araque, Carmignoto et al. 2014) et qu'ils sont primordiaux durant plusieurs étapes de la synaptogenèse des différents types de synapses (glutamatergiques, gabaergique, etc.) dans de nombreux modèles animaux et humains (voir review (Allen and Eroglu 2017)). À la jonction neuromusculaire, les CSPs, également nommées les cellules de Schwann terminales, sont une population distincte de cellules de Schwann qui sont non myélinisées et qui possèdent des rôles similaires aux astrocytes.

Dans la section subséquente, similairement aux astrocytes dans le SNC, les CSPs sont primordiales durant diverses étapes du développement et de la maturation de la JNM, pour le maintien ainsi que lors des mécanismes de réparations de cette dernière. La CSP est un élément actif dans la JNM : cette cellule gliale est en mesure de détecter, de différencier et de répondre spécifiquement suite à la libération des NTs. Elle est en mesure de moduler l'activité synaptique qu'elle détecte ainsi que détecter la dénervation et de favoriser les mécanismes de réparation sous-jacents pour assurer la réinnervation et l'homéostasie du système.

1.4.1 Caractéristiques générales des CSPs

Les CSPs sont une population cellulaire distincte des cellules de Schwann myélinisante (CSM) et elles se trouvent spécifiquement à la JNM. Chaque CSP s'appose parfaitement sur la terminaison axonale et recouvre un territoire spécifique et exclusif sur la JNM (Brill, Lichtman et al. 2011). Contrairement aux CSMs présentes autour des axones, les CSPs ne produisent aucune myéline. Malgré tout, de manière intéressante, ces cellules expriment certaines protéines de la myéline telle que la protéine 0, la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) ainsi que galactocerebroside (Georgiou and Charlton 1999). À la JNM, on retrouve entre 3 à 5 CSPs par JNM et ce nombre est proportionnel à la grandeur de cette dernière (Love and Thompson 1998, Lubischer and Bebinger 1999).

1.4.2 CSP détecte l'activité synaptique à la JNM

Comme les astrocytes dans le SNC, les CSPs détectent la relâche des NTs à la JNM. Les premières expériences effectuées chez les amphibiens utilisent une isolation « in situ » permettant de garder intacts les différents éléments de la JNM et d'investiguer leurs propriétés. Via la microscopie confocale et l'utilisation d'indicateur calcique intracellulaire qui permet d'observer les variations calciques à l'intérieur des CSPs, Jahromi et al., ont démontré pour la première fois que les CSPs détectent l'activité synaptique puisque l'utilisation de « ω -conotoxin GVIA », qui bloque spécifiquement ce mécanisme, a diminué la réponse calcique (Jahromi, Robitaille et al. 1992).

Les CSPs possèdent des récepteurs spécifiques aux NTs permettant de détecter l'activité synaptique. L'application locale des NTs et des agonistes des récepteurs (adénosine, muscarine) a permis de déterminer spécifiquement les récepteurs présents chez les CSPs. Chez les amphibiens, les CSPs répondent aux agonistes purinergiques via les récepteurs A1, P2Y ainsi que P2X (Robitaille 1995) à l'ACh via les récepteurs muscariniques (Robitaille, Jahromi et al. 1997) ainsi qu'à la substance P via les récepteurs NK1 (Bourque and Robitaille 1998). De plus, les CSPs possèdent des canaux calciques de type- L voltage-dépendant (Robitaille, Bourque et al. 1996). Des résultats similaires chez les mammifères sont également reportés au niveau des agonistes muscariniques ainsi que pour les récepteurs purinergiques A1 (Rochon, Rousse et al. 2001) et P2Y (Darabid, Arbour et al. 2013, Darabid, St-Pierre-See et al. 2018).

Cependant, ce n'est pas tous ces récepteurs qui sont essentiels pour la détection de l'activité synaptique. Afin de confirmer les récepteurs responsables de détecter l'activité synaptique, la stimulation du nerf moteur menant à la relâche endogène des NTs couplé à l'utilisation d'antagoniste spécifique ont permis d'investiguer ceci. Chez les amphibiens, les CSPs décodent l'activité synaptique avec les récepteurs purinergiques ioniques P2X et métabotropiques P2Y (Robitaille 1995) ainsi que muscariniques (Robitaille, Jahromi et al. 1997, Georgiou, Robitaille et al. 1999). Chez les mammifères l'activité synaptique est décodée via les récepteurs muscarinique et purinergiques A1 chez l'adulte (Rochon, Rousse et al. 2001) ou via les récepteurs purinergiques P2Y lors de la maturation de la JNM (Darabid, Arbour et al. 2013, Darabid, St-Pierre-See et al. 2018). Ces récepteurs sont, dans la majorité des cas, des récepteurs couplés aux protéines G qui activent des cascades moléculaires menant à une élévation intracellulaire calcique provenant du réticulum endoplasmique (Castonguay and Robitaille 2001, Rochon, Rousse et al. 2001). Ainsi, la présence de ces récepteurs permet de détecter l'activité synaptique.

1.4.3 CSP décode l'activité synaptique à la JNM

Les CSPs sont non seulement en mesure de détecter la relâche des neurotransmetteurs, mais elles sont en mesure de répondre différemment et de distinguer les patrons d'activité neuronale. L'une des études pionnières a démontré que les réponses calciques varient en fonction de la relâche de neurotransmetteur : une stimulation de plus grande fréquence induisent une réponse calcique d'une plus grande intensité et durée (Jahromi, Robitaille et al. 1992). Cette excitabilité calcique varie selon les différents patrons de stimulations : deux patrons de stimulations contenant un nombre identique de stimulations, mais qui diffèrent selon la présentation induit des réponses calciques distinctes (Todd, Darabid et al. 2010). Finalement, les CSPs répondent de manière distincte selon le type d'unité motrice présent à la JNM. Suite à un patron de stimulation identique, la cinétique de réponse calcique des CSPs (temps de réponse, le pourcentage de réponse maximal ainsi que le taux de réponse par stimulation) diffère selon un muscle possédant majoritairement des unités motrices lentes ou rapides (Rousse, St.-Amour et al. 2010). Cette adaptabilité est également présente durant la maturation de la JNM et sera discutée dans une section subséquente. Ainsi, cette excitabilité chimique représente un moyen pour les CSPs de décoder l'environnement synaptique.

1.4.4 CSP module les différents éléments synaptiques à la JNM

Les CSPs sont non seulement en mesure de détecter, de décoder et de s'adapter à la transmission synaptique, mais vont également être en mesure de moduler les différents éléments. Pour ce faire, les CSPs sont en mesure de sécréter des gliotransmetteurs qui vont agir principalement au niveau présynaptique et de manière autocrine sur les CSPs elles-mêmes. En effet, elles sont en mesure de synthétiser et de libérer du glutamate ainsi que certains neuromodulateurs tel que les prostaglandines (Auld and Robitaille 2003) et l'oxyde nitrique (Descarries, Cai et al. 1998).

1.4.4.1 CSP module la libération de neurotransmetteurs

Les CSPs sont en mesure de moduler la transmission synaptique. En effet, l'injection de GTPyS dans les CSPs, un analogue non hydrolysable induisant une augmentation non spécifique de l'activité des protéines G, a mené à une réduction de la relâche synaptique (Robitaille 1998). De manière intéressante, l'induction spécifique de la relâche intracellulaire calcique des CSPs via l'injection d'IP3 ou en bloquant la recapture du Ca^{2+} par les pompes ATPase calciques avec la thapsigargin potentialisent la transmission synaptique (Castonguay and Robitaille 2001). En ce sens, les CSPs sont en mesure de potentialiser de manière dépendante du calcium ou de diminuer via des cascades moléculaires liées aux protéines G indépendantes du calcium la transmission synaptique, renfonçant ainsi le rôle et l'influence de ces cellules gliales sur la transmission synaptique.

1.4.4.2 CSP module les mécanismes de plasticité à court-terme

Suite à une activité synaptique de fortes intensités, des changements de plasticité à court terme, généralement dues à des modifications présynaptiques peuvent être observés (Zucker and Regehr 2002). Brièvement, les CSPs modulent certains types de plasticité synaptique : la dépression due à la déplétion des réserves de vésicules synaptiques (Betz 1970) ou la facilitation suite à deux stimuli pairés induisant une augmentation de la relâche synaptique subséquente (Mallart and Martin 1968).

Les premières expériences clés ont manipulé directement les cascades moléculaires reliées aux récepteurs couplés aux protéines G puisqu'ils sont les acteurs principaux permettant la détection de l'activité neuronale. L'inactivation des protéines G via l'injection de GDPβS a

diminué la dépression post-tétanique tandis que la potentialisation non spécifique des protéines G en injectant GTP γ S, a bloqué la dépression synaptique post-tétanique (Robitaille 1998). L'utilisation d'un chélateur calcique tel le BAPTA spécifiquement dans les CSPs durant les protocoles de potentialisation a également perturbé le tout en induisant une dépression synaptique plus élevée (Castonguay and Robitaille 2001). En ce sens, les récepteurs des CSPs jouent un rôle dans les différents mécanismes de plasticité à court terme.

Les CSPs décodent et répondent distinctivement aux différents patrons de stimulation endogène qui induisent ces mécanismes de plasticité à court terme (Todd et al., 2010). Durant les protocoles de dépressions post-tétaniques, des réponses calciques de petites amplitudes et oscillatoires sont observées contrairement lors des protocoles de potentialisation post-tétanique, qui sont caractérisés par une réponse phasique. Cependant, l'activation des CSPs est-elle suffisante pour induire ces mécanismes? La photo-activation des CSPs, qui, suite à l'utilisation d'un laser, engendre une relâche précise de calcium encagé, a permis de reproduire de manière exacte le patron d'activation des réponses calciques des CSPs durant les protocoles de plasticité. Ceci a permis de mimer la plasticité endogène observée et également a permis d'identifier l'importance des récepteurs à l'adénosine A1 dans la dépression post-tétanique et A2A dans la potentialisation post-tétanique (Todd, Darabid et al. 2010). Toutefois, il est important de noter la persistance des mécanismes de plasticité à court-terme malgré l'inhibition calcique des CSPs. Ceci suggère que non seulement les CSPs sont important pour le balancement des mécanismes de potentialisation et de dépression synaptique, mais qu'il existe également d'autres mécanismes indépendants des CSPs qui sont responsables d'engendrer ces changements synaptiques puisque ces modifications persistent suite à l'inhibition spécifique des CSPs.

1.4.5 L'adaptabilité des CSPs

Les CSPs semblent être en mesure de moduler la relâche synaptique et les différents mécanismes de plasticité, cependant, sont-elles en mesure de s'adapter à court ou à long terme? À court terme, il est possible d'observer une désensibilisation des récepteurs muscariniques et purinergiques menant à une diminution de la réponse calcique. Cette désensibilisation est observée à différentes occasions : soit suite à l'application locale des agonistes ou lors de stimulation neuronale à haute fréquence (Rochon, Rousse et al. 2001). Chez les amphibiens, cette désensibilisation des récepteurs est attribuée à la relâche de la substance P et peut être renversée en

appliquant un antagoniste spécifique aux récepteurs NK-1 (Bourque and Robitaille 1998). Ceci démontre ainsi une adaptabilité des CSPs à court terme.

Un second type d'adaptabilité des CSPs a été observé lors de modification chronique de l'activité synaptique. D'une part, le blocage chronique des récepteurs nicotiniques de la fibre musculaire qui mène à des ajustements présynaptiques (Plomp, van Kempen et al. 1992) a prolongé les réponses calciques suite à l'application locale de l'ATP et de la muscarine. (Belair, Vallee et al. 2010). Également, suite à des stimulations chroniques du nerf, la sensibilité des récepteurs purinergiques et muscariniques a été respectivement augmentée et diminuée (Belair, Vallee et al. 2010). En ce sens, les CSPs sont en mesure de s'adapter lors de modification chronique de l'activité synaptique.

Finalement, les CSPs vont adapter leur décodage de l'activité synaptique selon le stade de développement de la JNM. Lors de la maturation des JNMs, les CSPs décodent l'activité synaptique avec les récepteurs purinergiques P2Y1 (Darabid, Arbour et al. 2013, Darabid, St-Pierre-See et al. 2018), tandis que dans les JNM matures, les CSPs décodent l'activité synaptique avec les récepteurs purinergiques A1 et muscarinique (Rochon, Rousse et al. 2001). Ainsi, les CSPs utilisent différents récepteurs pour décoder l'activité synaptique selon le stade développemental.

1.4.5.1 Le rôle des CSPs dans la formation et la maintenance de la JNM

Durant la neurogenèse, la JNM subit un processus complexe de formation et de maturation, dans lequel les CSPs jouent des rôles importants. Elles sont en mesure de sécréter différents éléments neurotrophiques telle la neuregulin 1 (Sandrock, Dryer et al. 1997) et GDNF (Wright and Snider 1996) ainsi que TGFβ1 (Feng and Ko 2008) qui assurent la stabilisation et la maturation des éléments pré- et postsynaptiques. De plus, des protéines dans leur matrice extracellulaire dont la MMP3 (anglais : *matrix metalloproteinase 3*) (Werle and VanSaun 2003) assure la conversion du pro-BDNF en m-BDNF, ces dernières qui sont respectivement importantes pour l'élimination ou la maintenance synaptique (Je, Yang et al. 2013).

L'arrivée massive et surnuméraire de différentes terminaisons axonales induit une polyinnervation des différentes plaques motrices (Chung and Barres 2009) qui enclenche l'ultime étape de maturation de la JNM : la compétition synaptique. Des études *in vivo* ont permis de démontrer que durant cette étape, les différentes terminaisons axonales vont contrôler des territoires distincts de tailles différentes. Au final, ce processus crucial et hautement dynamique

permet à une seule et unique terminaison axonale d'innervier la plaque motrice, mettant fin au processus de maturation. Les CSPs, lors de ce processus de maturation, vont jouer un rôle très important. Des études effectuées dans le laboratoire du Dr Robitaille ont démontré que les CSPs étaient non seulement en mesure de détecter l'activité synaptique des différentes terminaisons axonales, mais qu'elles étaient en mesure de distinguer la terminaison faible de la terminaison forte due non seulement à leur efficacité synaptique relative, mais également dû à la ségrégation des récepteurs purinergiques P2Y1 dans les CSPs (Darabid, Arbour et al. 2013, Darabid, St-Pierre-See et al. 2018).

Finalement, les CSPs vont participer aux processus d'élimination des terminaisons axonales en deux stades. Dans un premier temps, lorsque tous les MNs déchargent de manière synchrone, les CSPs vont faire des extensions de manière aléatoire qui vont obstruer la communication axonale avec les récepteurs AChR postsynaptiques de certaines terminaisons (Smith, Mikesch et al. 2013). Plus tardivement, suite à la désynchronisation de l'activation des différents MN, les CSPs vont être en mesure de détecter et de décoder ces différentes terminaisons afin de favoriser la terminaison forte. Elles vont, par la suite, phagocyter la terminaison axonale et digérer les axosomes via les mécanismes lysosomales (Song, Misgeld et al. 2008). Ainsi, les CSPs sont importantes pour la maturation des différents éléments synaptiques et participent activement aux processus de maturation de la JNM.

Dans les JNMs matures, les CSPs vont être également primordiales pour la maintenance de la JNM. Une ablation directe ne cause aucun effet synaptique à court terme, cependant, une ablation spécifique des CSPs en utilisant une lyse via les mécanismes de complément dirigé vers antigène 2A12, spécifique aux CSPs, a eu des répercussions sur la JNM (Reddy, Koirala et al. 2003). Une désorganisation des AChR ainsi que la rétraction des terminaisons axonales ont été observées : soutenant ainsi le rôle primordial des CSPs dans le maintien de la JNM.

1.4.5.2 Le rôle des CSPs durant les processus de réparations des JNMs

Suite à une lésion des nerfs moteurs, la dégénération de l'axone se fait via un mécanisme appelé la dégénérescence wallérienne. Durant ce processus, une multitude de mécanismes moléculaires sont activés et plusieurs acteurs cellulaires permettent la rétraction neuronale ainsi que le nettoyage de l'environnement lésionnel pour assurer les processus de réinnervation. Les

CSPs vont d'une part s'adapter, mais également participer au nettoyage des débris axonaux et favoriser la guidance axonale.

Les processus de dénervation vont enclencher des changements dans le protéome des CSPs. On note l'augmentation de la protéine « *glial fibrillary acidic protein* » (GFAP), une protéine importante du cytosquelette (Georgiou, Robitaille et al. 1994), une diminution de la protéine S100 β (Magill, Tong et al. 2007) ainsi que l'augmentation de Semaphorine 3A, une molécule chémiorepulsive (De Winter, Vo et al. 2006). Également, on observe une augmentation des protéines telle que « *growth-associated protein-43* » (GAP-43), « *nerve growth factor* » (NGF) récepteur p75, Nestin, dont leur rôle dans les adaptations morphologiques reste à déterminer (Sugiura and Lin 2011). Un second type d'adaptation des CSPs durant les processus de réinnervations a été observé récemment par des travaux effectués au sein du laboratoire. En effet, suite à une lésion neuronale, une diminution de la sensibilité des CSPs à la muscarine a été observée (Perez-Gonzalez, Provost et al. in prep) : sous-entendant une certaine adaptabilité afin de favoriser la réinnervation.

Suite à la dénervation, les CSPs vont générer des processus vers des JNMs intactes. L'arrivée de ce processus glial à une plaque motrice innervée adjacente permet de former un pont sur lequel la terminaison axonale peut croître (bourgeonnement terminal) jusqu'à la JNM dénervée à travers cette extension gliale (Figure 1.8) (Son and Thompson 1995). Ces processus sont induits lors de la dénervation ou lors du blocage de la transmission synaptique via la toxine botulique (Son and Thompson 1995) et une diminution du nombre de prolongement glial provoque une réduction majeure du nombre d'extensions terminal (Love, Son et al. 2003). Malgré tout, les mécanismes moléculaires induisant l'extension des CSPs nécessitent davantage d'investigation. Quelques acteurs semblent jouer un rôle durant les processus de réinnervation. L'inhibition de la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) empêche la formation des extensions gliales (Marques, Pereira et al. 2006). Une augmentation de l'expression de NRG1 est observée après la dénervation (Carroll, Miller et al. 1997) et l'application exogène de NRG1 induit des extensions gliales similaires à ceux observés durant les processus de réparation (Hayworth, Moody et al. 2006). Ainsi, les CSPs sont en mesure de générer des extensions afin de favoriser l'innervation des JNMs dénervées.

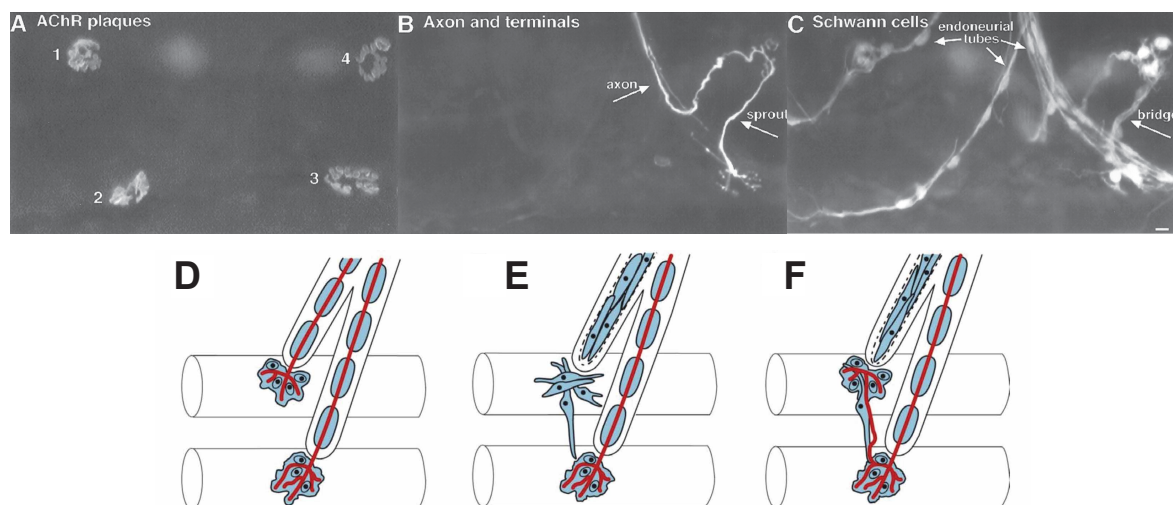


Figure 1.8 Le rôle des CSPs durant les processus de réparations des JNMs.

A-C. Soleus de rat après 3 jours suivant la dénervation. Les CSPs font des extensions des plaques motrices dénervées (A1, A2, A3). Lorsqu'une extension gliale atteint une 2^e JNM, ceci forme un pont (C : *bridge*). Ceci induit l'extension de la terminaison axonale de la plaque motrice innervée (bourgeon terminal) qui favorise l'innervation de la plaque motrice dénervée (C : plaque motrices #3 innervée par une extension de la plaque motrice #4). D-F Dessins illustrant le phénomène observé en A-C. Panneau du haut adapté de (Love and Thompson 1999) Droits obtenus de Society of Neuroscience et Copyright Clearance Center. Panneau du bas est adapté de (Kang, Tian et al. 2003). Droits obtenus Springer Nature et Copyright Clearance Center. Autorisation de traduction n'a pas été obtenu par Society of Neuroscience ni Springer Nature.

Lors des processus de réparations, la rétraction des terminaisons axonales va causer l'accumulation de débris cellulaires dans le tube endoneural, soit la matrice extracellulaire créée par les CSMs qui persistent lors de la rétraction de l'axone (Rotshenker 2011). Les CSMs vont phagocyter ces débris (Brosius Lutz, Chung et al. 2017) et sécréter des chimiokines ainsi que la lectine Galectin-3 permettant le recrutement de macrophage pour assurer la clairance des débris issus de la dénervation (Rotshenker 2009, Rotshenker 2011). Ce processus de clairance est primordial au bon déroulement de la régénération axonale (Kang and Lichtman 2013). Les CSPs participent également à cette clairance des débris. Des fragments de terminaison axonale ont été retrouvé dans des vésicules contenus dans les CSPs (Duregotti, Negro et al. 2015) : démontrant ainsi que les CSPs participent à la phagocytose des terminaisons axonales.

Finalement, un dernier élément important lors des processus de réinnervation est la présence et le recouvrement des CSPs sur la plaque motrice. Il a été démontré récemment que le recouvrement des CSPs à la plaque motrice dénervée est essentiel pour la réinnervation. En effet, les plaques motrices exemptes de recouvrements gliaux ne sont pas réinnervées et donc, éventuellement, dégradées (Kang et al., 2014). En ce sens, les CSPs sont essentielles aux processus de réinnervation de la JNM suite à une lésion neuronale.

1.5 Les altérations des JNMs dans la SLA

Il a été discuté précédemment de l'altération de différents types cellulaires et de leur implication dans le développement ainsi que dans la progression de la SLA. Dans les modèles animaux, une altération de la JNM est observée bien avant l'apparition des premiers symptômes moteurs et avant la mort d'un motoneurone dans la moelle épinière (Fischer, Culver et al. 2004, Pun, Santos et al. 2006, Vinsant, Mansfield et al. 2013, Tallon, Russell et al. 2016). Ces altérations incluent une morphologie de la JNM anormale, des altérations synaptiques ainsi qu'un phénomène de dénervation.

1.5.1 Les réorganisations synaptiques

Une réorganisation de la JNM est observée avant l'apparition des symptômes et dont certaines UMs sont plus vulnérables et présentent davantage de signes de réorganisation synaptique. Une dénervation de la plaque motrice ainsi qu'une perte de protéines synaptiques sont observées dans un premier temps chez les fibres unités motrices rapides et fatigables (Pun, Santos et al. 2006), montrant ainsi une plus grande vulnérabilité à la dénervation, suivies par les fibres rapides et résistantes à la fatigue (FR) et les fibres lentes (S) (Frey, Schneider et al. 2000, Pun, Santos et al. 2006, Hegedus, Putman et al. 2007, Hegedus, Putman et al. 2008). Au niveau des UMs touchées, on observe la présence anormale de récepteurs ectopiques, soit des regroupements distincts de récepteurs nicotiniques sur une même fibre motrice ainsi qu'une diminution du marquage des récepteurs postsynaptiques (Tremblay, Martineau et al. 2017). Une dénervation partielle et parfois complète de la plaque motrice peut être observée. Un mécanisme compensatoire de réinnervation se produit et sera discuté dans la section suivante (section 1.5.3).

1.5.2 Les altérations synaptiques

Non seulement il est possible d'observer des altérations de la morphologie des JNMs, mais des altérations dans les propriétés synaptiques intrinsèques à la JNM et au niveau des motoneurones ont été observées. Ces altérations synaptiques ont été reportées dans les modèles SOD1, TDP43 et FUS. Cependant, il faut noter que plusieurs recherches ont mené à des résultats contradictoires. De manière générale, l'altération d'excitabilité des motoneurones et synaptique des JNMs semble être dépendante de la mutation exprimée, du stade de la maladie étudié ainsi que du type d'unité motrice investiguée. Dans les modèles FUS, une réduction du contenu quantique et de l'amplitude de

courant synaptique sont observées (Shahidullah, Le Marchand et al. 2013, Machamer, Collins et al. 2014). Dans le muscle du diaphragme chez le modèle murin SOD1^{G93A} des résultats contradictoires ont été reportés : durant le stade présymptomatique, une diminution de la probabilité de relâche a été observée (Souayah, Coakley et al. 2012) tandis que, dans un groupe spécifique de JNM, une augmentation a été observée (Rocha, Pousinha et al. 2013). Cette distinction observée par Rocha et al fut abolie lors de la phase symptomatique de la SLA, puisque ces deux groupes distincts de JNMs dans le diaphragme avaient des altérations synaptiques (Rocha, Pousinha et al. 2013). Appuyant ainsi l'hypothèse au sujet de l'atteinte différentielle des NMs, des JNMs et des UMs.

Une étude effectuée au sein du laboratoire du Dr Robitaille a permis de clarifier ces contradictions en démontrant l'importance du type d'UM dans les altérations synaptiques en fonction du stade de la SLA (Tremblay, Martineau et al. 2017). Brièvement, des changements synaptiques sont observés à des stades présymptomatiques et lors du déclenchement de la maladie spécifiquement aux UMs plus vulnérables (FF). De manière intéressante, une augmentation du contenu quantique est reportée spécifiquement au niveau des UMs plus résistants (S) au stade asymptomatique. Sachant que les UMs ont une activité synaptique plus basse que les FF, certains postulent que ces changements synaptiques observés seraient des mécanismes compensatoires qui pourraient être, au final, protecteur. En effet, l'augmentation de l'excitabilité des MNs a eu un effet neuroprotecteur : ceci a permis de renverser le mauvais repliement de SOD1 tandis qu'une diminution a accéléré la progression de la maladie (Saxena, Roselli et al. 2013). Ainsi, des changements synaptiques sont observés à des stades symptomatiques et qui dépendent du type d'UM.

1.5.3 La dénervation : un processus dynamique

Un autre phénomène observé dans les JNMs dénervées est la présence de mécanisme de réinnervation compensatoire suggérant un processus dynamique avec plusieurs tentatives de réparations. En effet, dans les UMs FF dénervées, la présence d'axone de plus petits calibres innervant habituellement les unités motrices S et FR sont reportés (Schaefer, Sanes et al. 2005, Hegedus, Putman et al. 2008). Cependant, malgré tout, ces mécanismes compensatoires vont recouvrir partiellement et de manière incomplète la plaque motrice (Arbour, Tremblay et al. 2015, Tremblay, Martineau et al. 2017). On observe dans ces JNMs la présence d'extension de la

terminaison axonale partant de la plaque motrice (Figure 1.8F : bourgeonnement axonal) ainsi qu'une polyinnervation, soit plusieurs terminaisons axonales innervant la plaque motrice (Arbour, Tremblay et al. 2015, Tremblay, Martineau et al. 2017) : des phénomènes reportés lors des tentatives de réparation à la JNM (section 1.4.5.2). Des altérations au niveau de la cellule gliale sont également observées et seront discutées dans la section subséquente.

Afin d'investiguer le phénomène de dénervation Martineau et al., ont utilisé une lignée de souris dont un faible pourcentage de motoneurones exprimait le marqueur fluorescent YFP. L'utilisation d'imagerie *in vivo* de manière répétitive a permis d'étudier de manière précise le phénomène de dénervation à travers le décours de la maladie. Martineau et al., ont réussi à démontrer que non seulement la dénervation d'une unité motrice, soit la terminaison axonale avec ces nombreuses fibres musculaires, se fait de manière asynchrone, mais également, que ce phénomène de dénervation semble être un phénomène qui se propage de manière spatiale et temporelle, partant de la première JNM dénervée vers les JNMs les plus proches, appartenant ou non à la même unité motrice (Martineau, Di Polo et al. 2018). Ceci illustrant la possibilité d'un facteur extrinsèque, présent au niveau synaptique, qui s'étend de manière spatiale, affectant ainsi les JNMs environnantes.

En ce sens, ces nombreuses altérations fonctionnelles mentionnées précédemment possèdent un dénominateur commun, une cellule qui est responsable non seulement pour le maintien de la morphologie de la JNM, mais également crucial pour l'activité synaptique et assure le bon déroulement des processus de réparations : le troisième élément de la synapse tripartite, la cellule de Schwann périssynaptique.

1.5.4 L'implication des CSPs dans la SLA

Dans la sclérose latérale amyotrophique, il a été discuté précédemment des différentes altérations synaptiques et morphologiques qui surviennent bien avant non seulement l'arrivée des symptômes moteurs, mais avant la mort des motoneurones. Sachant que les CSPs sont essentielles pour le maintien et la stabilité des JNMs, ainsi que pour les différents mécanismes de plasticité synaptique et de réparation, contribuent-elles à l'établissement de ses altérations observées à la JNM? Les CSPs, via l'activation des récepteurs muscariniques, décodent l'activité synaptique et s'adaptent à son environnement afin d'effectuer le rôle opportun. Cette capacité à décoder est-elle affectée et contribue-t-elle à la sensibilité différentielle des unités motrices à la dénervation qui est observée?

Comme démontré récemment par Martineau et al., la dénervation des JNMs est un phénomène qui apparaît avant la mort des MNs et dans lequel des mécanismes de réparation compensatoires, mais inefficaces mènent malgré tout à une dénervation complète (Martineau, Di Polo et al. 2018). Certains groupes ont également observé une déficience des mécanismes de réparation tels qu'un ralentissement de la croissance axonale ou l'accumulation de débris suite à une lésion induite dans les modèles de SLA (Pun, Santos et al. 2006, Carrasco, Bahr et al. 2016). Sachant que les CSPs participent activement à différentes étapes de ce processus, les CSPs sont-elles adéquates ou nuisent-elles à la réinnervation? Il a été possible d'observer des signes de réparations gliales normales. En effet, la présence des extensions gliales chez les patients SLA ainsi que dans des modèles murins a été reportée et ceci pourrait sous-entendre ainsi le maintien des fonctions gliales (Frey, Schneider et al. 2000, Gordon, Hegedus et al. 2004, Gould, Buss et al. 2006, Arbour, Tremblay et al. 2015, Tallon, Russell et al. 2016). Cependant, plusieurs études démontrent malgré tout certaines particularités ne favorisant pas une réinnervation adéquate.

Dans un premier temps, des altérations morphologiques des CSPs ont été observées à des stades présymptomatiques, soit avant le commencement des phénomènes de dénervation (Arbour, Tremblay et al. 2015, Carrasco, Bahr et al. 2016). Également, des données récentes du laboratoire démontrent que les CSPs adoptent un phénotype nuisible aux processus de régénération neuronale. D'une part, les extensions gliales provenant des JNMs dénervées semblent désorganisées, non dirigées et inadéquates pour favoriser les processus de réinnervations (Martineau, Arbour et al. in prep). De plus, certaines CSPs des JNMs dénervées semblent incapables d'augmenter l'expression

de MAG-2, une lectine essentielle pour la clairance des débris extracellulaire suite à la dénervation des JNMs (Martineau, Arbour et al. in prep). Finalement, l'expression de Semaphorin 3A, une molécule chémo-répulsive neuronale, est exprimée dans les CSPs des JNMs des UM les plus vulnérables (FF). Cette particularité pourrait repousser les axones tentant de réinnervier les JNMs (De Winter, Vo et al. 2006). Ainsi, les CSPs semblent adopter une morphologie inadéquate et favoriser l'instabilité des JNMs tout en empêchant les mécanismes de réinnervation compensatoire.

Ainsi, sachant que les CSPs sont en mesure de s'adapter selon le contexte synaptique, est-ce que les CSPs décodent de manière appropriée leur environnement synaptique afin de s'y adapter? Comme mentionné précédemment, lors du processus de maturation des JNMs (section 1.4.5.1) ainsi que lors des processus de réparations des JNMs (section 1.4.5.2), les CSPs vont s'adapter et décoder la transmission synaptique avec une contribution plus grande des récepteurs purinergiques et plus basses des récepteurs muscariniques (Darabid, Arbour et al. 2013, Darabid, St-Pierre-See et al. 2018, Perez-Gonzalez, Provost et al. in prep). Des travaux du laboratoire ont démontré un décodage inadéquat des CSPs bien avant la dénervation des JNMs (Arbour, Tremblay et al. 2015, Martineau, Arbour et al. in prep). D'une part, une sensibilité aux différents agonistes, l'activation des CSPs et la contribution des récepteurs à cette activation sont altérées dans les muscles vulnérables (Arbour, Tremblay et al. 2015, Martineau, Arbour et al. in prep). En effet, dans les muscles vulnérables, une augmentation de la contribution des récepteurs muscariniques est observée. Ainsi, cette contribution inappropriée des récepteurs muscariniques mènerait à un décodage inadapté, empêchant ainsi les CSPs d'adopter leur phénotype de réparation assurant une réinnervation appropriée de la JNM. Ainsi, est-ce que ce phénomène est observé dans JNMs des muscles résistants tels les muscles extraoculaires?

1.6 Objectifs

En résumé, la SLA est une maladie neurodégénérative complexe qui se caractérise par la mort de motoneurones et dont les cellules gliales environnantes contribuent au développement ainsi qu'à la progression de la maladie. Il existe une vulnérabilité différentielle au processus de dénervation. Les muscles extraoculaires possèdent une résistance remarquable durant la progression de la SLA. Des altérations des JNMs sont observées avant la mort des motoneurones et ceci semble être dépendant de l'unité motrice. Dans les JNMs, les CSPs, qui sont primordiales à la stabilité ainsi qu'aux différents processus de réparation, possèdent des altérations dans leur moyen de décoder l'activité synaptique bien avant l'apparition de la maladie.

De plus, on a vu que la JNM est une structure complexe dont la fonction et la structure sont étroitement régulées. Quels sont les éléments neuromusculaires des EOMs qui les distinguent des muscles vulnérables qui pourraient contribuer à leur résistance à la SLA? En ce sens, quels aspects des JNMs des muscles extraoculaires pourraient leur conférer cette résistance particulière? Nous émettons l'hypothèse suivante :

Le maintien adéquat du décodage synaptique des CSPs dans les muscles extraoculaires permet de conférer cette résistance au processus de dénervation dans la SLA. Ceci va permettre l'expression spécifique de certaines protéines favorisant le maintien des éléments synaptiques (Figure 1.9).

Pour investiguer les différents éléments qui pourraient expliquer cette résistance, dans le mémoire suivant, une analyse morphologique des JNMs, l'investigation du décodage synaptique des CSPs ainsi qu'une analyse protéomique comparative entre les JNMs résistantes et vulnérables dans la SLA ont été effectuées afin de discuter de leur contribution à cette résistance particulière.

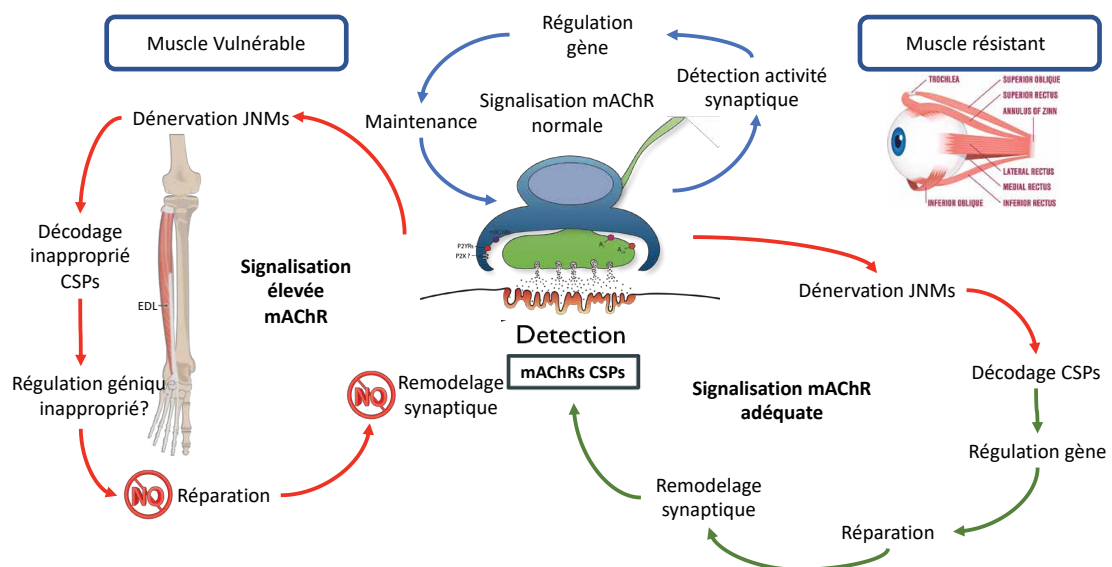


Figure 1.9 Mécanisme potentiel conférant résistance des JNMs des EOMs dans la SLA.

Image obtenue de Nijssen J et al. Acta Neuropathol. 2017. Creative Commons Attribution 4.0 International License

Chapitre 2 - Matériel et Méthode

2.1 Animaux

2.1.1 La lignée employée

Dans les expérimentations présentées dans ce mémoire, des souris transgéniques C57BL/6 du laboratoire Jackson qui expriment le gène humain *SOD1* possédant la mutation G37R (remplacement d'une glycine par une arginine à la position 37) (*SOD1*^{G37R}) ont été utilisées. Plus précisément, la lignée 29 utilisée se caractérise par l'expression de 2 copies du gène humain *SOD1*. Dans cette lignée spécifique, comparativement au niveau d'expression endogène, on retrouve une augmentation de l'expression de la protéine *SOD1* d'environ 2.5 fois dans la moelle épinière (Martineau, Arbour et al. in prep) ainsi qu'entre 2 et 5 fois dans le cerveau et le tronc cérébral (Wong, Pardo et al. 1995). Comme présenté dans l'introduction (section 1.2.3.5), cette expression anormale de la protéine SOD1 cause des altérations cellulaires qui génèrent des syndromes moteurs observés dans la sclérose latérale amyotrophique : un affaiblissement et une paralysie progressive des muscles des membres supérieurs et inférieurs attribués par la mort des motoneurones dans la moelle épinière (Tremblay, Martineau et al. 2017).

2.1.2 Description des stades de la SLA dans les modèles murins

Afin de déterminer le génotype de chaque souris, nous avons prélevé un échantillon de la queue et amplifié le gène humain *SOD1* par PCR. Les extraits ont été prélevés immédiatement après sevrage, soit entre 21 et 30 jours postnataux. Les souris n'exprimant pas le gène muté ont été utilisées comme souris contrôle (WT). Dû aux différences et aux ambiguïtés reliées par les différences sexuelles, les souris mâles ont été utilisées pour les expériences (Martineau, Di Polo et al. 2020).

Pour répondre aux différents objectifs et hypothèses établis, les souris ont été sacrifiées à différents stades de la maladie. Ce modèle murin se distingue par une apparition tardive des symptômes ainsi que par une progression plus lente de la maladie. Comme publié précédemment par Tremblay et al. (2017), la médiane d'âge d'apparition des symptômes est observée à P450, soit entre P420-P460. À ce moment précis, la masse des animaux est maximale avant de diminuer tout au long de la maladie. Trois stades ont été utilisés dans ce projet. Le premier stade utilisé est le stade présymptomatique. Ce stade, qui se situe vers P380, soit entre P370 et P400, se décrit par la période

de temps qui précède l'apparition des altérations morphologiques et des symptômes moteurs. Ainsi, durant cette période, les souris ne présentent aucune perte de poids ainsi qu'aucun symptôme moteur. Suite à l'apparition de la maladie, un stade symptomatique précoce est observé. À ce second stade, les animaux ont perdu environ 10% de masse et présentent certains symptômes moteurs telle que la perte de réflexion d'extension des membres inférieurs ainsi qu'une démarche chancelante. Nous observons ce stade environ à P480, soit entre P460-P520. Par la suite, les souris atteignent un troisième stade plus tardif de la maladie. Durant cette période, on peut observer une perte de masse supérieure de 20% ainsi qu'une paralysie prononcée des membres inférieures vers P535, soit entre P520-P560. Ceci représente la phase terminale de la maladie. Ces stades ont été déterminés en évaluant hebdomadairement le poids de chaque souris et en effectuant des tests comportementaux. Les animaux ont été euthanasiés en utilisant une dose létale d'isofluorane suivis par une exsanguination.

Toutes les expériences ont été effectuées en respectant les lignes directrices sur le maintien et les soins de santé en animalerie approuvée par le Conseil Canadien de Protection des Animaux ainsi que par le Comité de Déontologie sur l'Expérimentation Animale de l'Université de Montréal.

2.2 Préparations neuromusculaires des muscles oculomoteurs

2.2.1 Dissection générale

Afin d'assurer le bon déroulement du prélèvement de la préparation neuromusculaire des muscles oculomoteurs, une solution saline physiologique Ringer a été utilisée. Cette solution contient les composés suivants (mM) : 110 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₂, 2 CaCl₂, 11 glucoses, 0.3 glutamate, 0.4 glutamine, 5 BES (C₆H₁₅NO₅S), 4.34 X 10⁻⁷ thiamine décarboxylase et de 0.036 choline chloride. Les expériences ont été effectuées à 27 ± 2°C sous une perfusion constante de solution oxygénée (95% O₂, 5% CO₂) à un pH de 7.4.

Pour isoler adéquatement les muscles oculomoteurs murins, dans un contenant profond rempli préalablement de Silgard (Dow Corning, Silicone Elastomer Kit) :

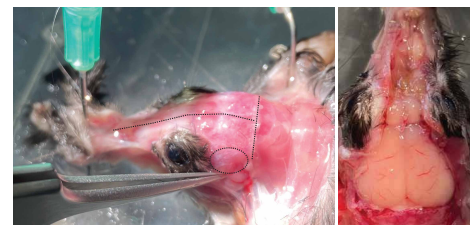
- 1) Stabilisez la tête de la souris en épinglant le museau et proche des oreilles.



- 2) Retirez la peau du crâne tout en gardant une certaine quantité de peau autour des paupières (bien humidifier).



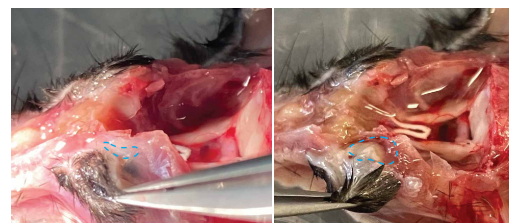
- 3) Enlevez les muscles des joues puis retirez tous les os du crâne jusqu'à l'os nasal grâce aux ciseaux robustes prévus à cet effet (FST, 15124-12).



- 4) Retirez le cerveau en coupant proche du tronc cérébral en faisant bien attention de ne pas toucher tous les nerfs se trouvant au fond de la boîte crânienne.



- 5) Coupez la peau en dessous de l'os supérieur et de l'arcade zygomatique. Ceci va permettre de faire une fente assurant ainsi de perfuser de manière constante les muscles oculomoteurs pour le restant de l'extraction.



- 6) Retirez les tissus mous se trouvant au niveau de la cavité nasale ainsi qu'en dessous de l'œil pour garder uniquement les os du crâne, le palais ainsi que les deux yeux.



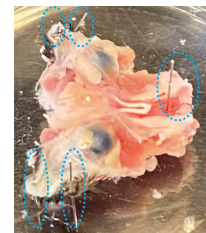
- 7) Effectuez un trou au centre de la cavité du crâne à l'aide d'une mèche (Meisinger).



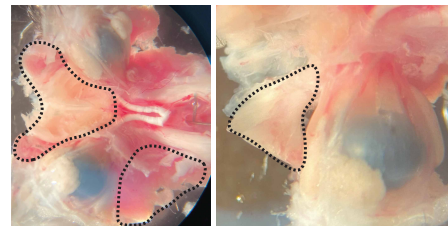
- 8) Afin de procéder à une dissection plus fine, détachez la préparation neuromusculaire des muscles oculomoteurs en coupant de manière transverse au niveau du tronc cérébral et déplacez dans un contenant de volume plus petit.



- 9) Afin de s'assurer d'un niveau de tension musculaire adéquat des muscles oculomoteurs, placez plusieurs épingles au niveau de la paupière inférieure et supérieure des yeux gauche et droit ainsi que dans l'orifice traversant le palais.



- 10) Retirez les os recouvrant les muscles oculomoteurs ainsi que suivant les tissus mous les recouvrant afin d'exposer uniquement les muscles suivants : les rectus droits supérieur, latéral, médial, inférieur, les rectus obliques supérieur, inférieur et les muscles des paupières inférieur et supérieur.



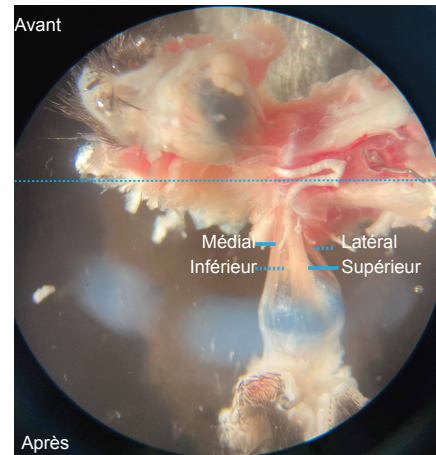
- 11) Retirez les glandes lacrymales de chaque œil



- 12) Pour l'analyse des JNMs des différents rectus, fixez pendant 15 minutes dans la PFA 4% puis

lavez à trois reprises pendant 5 minutes avec une solution de PBS.

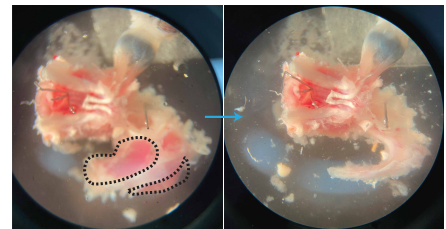
- 13) Pour l'extraction des protéines, coupez individuellement chaque rectus et les congelez rapidement dans l'azote liquide.



2.2.2 Préparation des tissus pour l'imagerie calcique

Afin d'obtenir une préparation neuromusculaire adéquate pour effectuer les expériences d'imagerie dynamique, le muscle oculomoteur supérieur gauche a été isolé dû à sa facilité d'accès. Ceci permet donc de diminuer les manipulations effectuées et ainsi de réduire le risque d'endommager la préparation neuromusculaire.

- 1) Pour ce faire, répéter les étapes 1 à 7 mentionnées ci-dessus
- 2) Afin de stabiliser au maximum et d'assurer une immobilité adéquate de la préparation, un deuxième orifice est nécessaire. Retirez complètement l'œil droit ainsi que tous les tissus dans l'arcade zygomatique droit jusqu'à l'exposition des os maxillaire et zygomatique.



- 3) Effectuez une deuxième incision à travers l'os zygomatique grâce à une mèche (Meisinger)



- 4) Refaites les étapes 8 à 11 mentionnées ci-dessus afin de finaliser l'extraction de la préparation.

2.3 Marquage immunohistochimique des JNMs

Les différents compartiments de la JNM des muscles oculomoteurs ont été marqués grâce à un marquage immunohistochimique, soit via l'utilisation d'anticorps reconnaissant des antigènes spécifiques aux protéines de la JNM. Ces muscles ont été fixés pendant 15 minutes dans de la paraformaldéhyde 4% dilué dans une solution de PBS (en mM : 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄, 2KH₂PO₄) à température ambiante. Les préparations ont été par la suite perméabilisées à l'aide d'une solution froide de 100% méthanol pendant 6 min à -20°C. Afin d'éviter un marquage non spécifique des anticorps utilisés, chaque préparation a été incubée pendant 20 min avec une solution contenant 10% *normal donkey serum* dans du PBS contenant 0.01% Triton X-100 pour 20 min à température ambiante.

Les cellules de Schwann pérисynaptiques ont été marquées avec l'anticorps anti-S100β lapin (1 :250, Dako, Z031) pendant une durée de deux heures. Les axones et les éléments présynaptiques terminaux ont été marqués avec respectivement les anticorps anti-neurofilament M [NF-M] poulet (1 :2000, Rockland Immunochemicals, 212-901-D84) et anti-synaptique vesicular protein 2 [SV2] souris IgG1 (1 :2000, Developmental Studies Hybridoma Bank) pour une durée de 2 heures également.

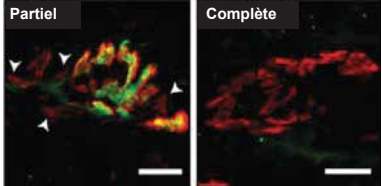
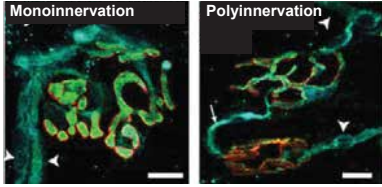
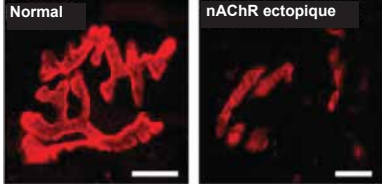
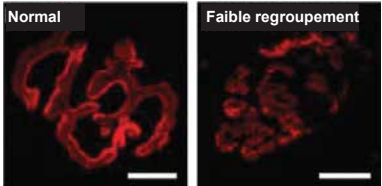
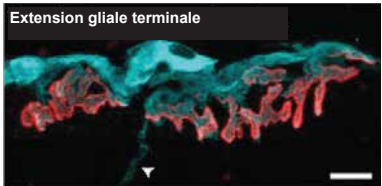
Les muscles ont été incubés par la suite avec les anticorps secondaires suivants : chèvre anti-souris IgG1 Alexa 488 (1 :500, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-545-205), âne anti-poulet Alexa-488 (1 :500, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 703-545-155), âne anti-lapin Alexa-647 (1 :500, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-605-152) pendant 1 heure. Finalement, les récepteurs postsynaptiques cholinergiques nicotiniques (nAChRs) ont été marqués avec la toxine α-bungarotoxine conjuguée à l'Alexa-594 (2.0 µg/ml, Invitrogen, B13423). Toutes les incubations avec les anticorps ont été effectuées dans une solution de PBS contenant 0.01% Triton X-100 et 2% « normal donkey serum » à température ambiante et entre chaque différente incubation, les muscles ont été rincés à trois reprises avec une solution de PBS contenant 0.01% Triton X-100 pendant 5 minutes. Tous les muscles ont été montés sur lame avec le Prolong Gold antifade reagent DAPI (Invitrogen, P36935). Ce milieu de montage contenant spécifiquement du DAPI a permis de marquer les noyaux de toutes les cellules présentes dans la préparation neuromusculaire.

Les différents éléments de la JNM ont été imagés via le confocal Zeiss LSM 880. L'objectif à l'huile 63X (Plan-APOCHROMAT, 1.40 NA DIC M27) a été utilisé. Le laser Argon, (455 nm) excite l'élément présynaptique marqué par les molécules Alexa-488 (488 nm), qui, à leur tour, émettent des photons détectés par une fenêtre spectrale se situant entre 509-571 nm. Les lasers HeNe1 (543 nm) et HeNe2 (633 nm) vont respectivement exciter les éléments postsynaptiques, marqués par les molécules Alexa-594 et les éléments gliaux marqués par les molécules Alexa-647. Les photons émis par l'excitation des Alexa-594 (594 nm) ou des Alexa-647 (647 nm) sont détectés par les fenêtres spectrales suivante : 585-631 nm ainsi que 655-756 nm. Finalement, le laser Argon (351 nm) excite le DAPI (405 nm) marquant les noyaux et les photons émis ont été détectés avec une fenêtre spectrale de 410-491 nm. Des images de 640 X 640 pixels ont été acquises à une vitesse de 3.30 μ sec par pixel ainsi qu'un filtre Kalman pour minimiser le bruit de fond (Tremblay, Martineau et al. 2017). Sur chaque JNM, l'acquisition de plusieurs images a été effectué. Ceci a permis de créer un montage des images consécutives (intervalle en z de 10 μ m) d'une même JNM permettant ainsi d'effectuer une analyse morphologique adéquate.

2.4 Analyse morphologique des JNMs

L'analyse morphologique des JNMs a été effectuée sur plusieurs critères publiés antérieures (Darabid, Arbour et al. 2013, Arbour, Tremblay et al. 2015, Tremblay, Martineau et al. 2017).

Tableau 2.1 Critères d'évaluations de la morphologie des différents éléments de la JNM

	Critères	Description	Exemple
Présynaptique	Recouvrement plaque motrice	<p>Dénervation complète : lorsque la plaque motrice, n'a aucun recouvrement de la terminaison axonale</p> <p>Partiellement recouverte : lorsque la plaque motrice est recouverte à 90% et moins par la terminaison axonale.</p> <p>Totalement recouverte : lorsque la plaque motrice est recouverte à plus de 90% par la terminaison axonale.</p>	
	État d'innervation	<p>Monoinnervation : lorsque la plaque motrice est innervée par une seule et unique terminaison axonale.</p> <p>Polyinnervation : lorsque la plaque motrice est innervée par plusieurs terminaisons axonales.</p>	
Postsynaptique	Récepteurs ectopiques	Lorsque sur la même fibre musculaire on retrouve deux regroupements de récepteurs nAChR d'une distance minimale de 5 µm.	
	Faible regroupement	Lorsque la plaque motrice ressemble à celle retrouvée dans une JNM immature, on observe un marquage des récepteurs nACh mal défini ainsi que leur distribution non uniforme.	
Gliale	Extensions gliales terminales	Lorsqu'une CSP va créer une extension fine au-delà de la plaque motrice de plus de 10 µm exempt de terminaison axonale.	

Adapté de Tremblay et al., J. Neuroscience (2017). Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY).

2.5 Imagerie calcique des CSPs

Pour effectuer l'imagerie calcique, l'utilisation d'une méthode préalablement publiée a permis d'incorporer un indicateur calcique efficacement dans les CSPs (Georgiou, Robitaille et al. 1999, Rousse, St.-Amour et al. 2010, Todd, Darabid et al. 2010, Arbour, Tremblay et al. 2015). Les préparations neuromusculaires des muscles oculomoteurs ont été incubées à deux reprises : une première incubation suivie immédiatement d'une deuxième dans d'une solution fraîche oxygénée. Les deux incubations sont d'une durée de 45 minutes et dans une solution préoxygénée de Ringer contenant 10 μ M fluo-4AM (Invitrogen, F14202) et 0.02% d'acide pluronique (Invitrogen, P6867) à $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Par la suite, les récepteurs nACh ont été marqués avec 10 μ L de toxine α -bungarotoxine conjuguée à l'Alexa-594 (2.0 $\mu\text{g/ml}$, Invitrogen, B13423) en incubant pendant 15 minutes à la même température.

Les expériences ont été effectuées sur un microscope confocal Olympus FV1000. Dans un premier temps les récepteurs nACh des JNMs marqués par α -bungarotoxine conjuguée à l'Alexa-594 ont été localisés par observation directe au microscope droit. Les préparations étaient exposées à de la lumière de longueur d'onde de 594 nm émise par une lampe diode (filtre d'excitation passe-bande 570 – 670 nm) et observées à l'aide d'objectifs à immersion (20x, 0.95 NA, XLUMPlanFI et 60x, 0.90 NA, LUMPLFLN). Dans un second temps, l'activité calcique des CSPs a été observée via l'imagerie dynamique. Les CSPs qui contiennent l'indicateur calcique fluo-4AM ont été exposé à de la lumière de longueur d'onde de 488 nm émise par une lampe argon (filtre d'excitation passe-bande 500 – 545 nm) et observées à l'aide de l'objectif à immersion (60x, 0.90 NA, LUMPLFLN). La vitesse d'acquisition utilisée est de 4.0 μ s par pixel pour une image de 256 X 256 pixels. Pour chaque enregistrement, un niveau de fluorescence basale des CSPs entre 150-300 pixels et un agrandissement maximal de 2.5 fois ont été utilisés. Les changements de fluorescence des CSPs ont été déterminés avec la formule suivante:

$$\% \Delta F / F = (F - F_{\text{base}}) / F_{\text{base}} \times 100.$$

Afin d'induire des réponses calciques des CSPs, des applications locales d'agonistes ont été effectuées. À chaque application, une pression positive de 20 PSI pour une durée de 150 ms a été générée par un Picospritzer II (Parker Instruments). Une pipette de verre (Borosilicate Glass, BF120-94-10, ~2-mm OD : 5 M Ω) a été utilisée. L'Adenosine 5'-triphosphate (ATP : 10 μ M Sigma) et la muscarine (20 μ M, Sigma) ont été dissous dans la solution de Ringer puis appliquées

à une distance d'environ 20-30 μm des CSPs d'une JNM. Cette opération a été répétée sur plusieurs JNMs à la surface d'un même muscle. Un intervalle minimal de 20 minutes pour des applications successives sur la même cellule a été octroyé dû à la désensibilisation des récepteurs muscariniques observée (Jahromi, Robitaille et al. 1992).

2.6 Extraction protéique

Pour extraire les protéines des différentes préparations neuromusculaires, les échantillons ont été homogénéisés mécaniquement avec une solution d'un ratio 5:1 (volume:masse) de RIPA Lysis Buffer (50 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% SDS, *Sigma protease inhibitors* P8340 1:500, et 0.5% *Sodium deoxycholate*). Les échantillons ont par la suite été incubés dans ce tampon pendant 1h sous agitation à 4°C puis passés dans un sonicateur à 3 reprises pendant 10 secondes avant d'être centrifugés à 4°C pendant 30 minutes à 20800 g pour finalement extraire le surnageant.

La quantification de la concentration protéique a été effectuée grâce à un kit (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific, #23225). Pour chaque préparation, 3 échantillons contenant respectivement 1 μL , 1.5 μL et 2 μL d'extrait protéiques ont été utilisés afin de déterminer avec précision la concentration de protéine de chaque échantillon.

2.7 Détermination du profil d'expression protéique

Afin de déterminer les différents profils d'expression des protéines des échantillons désirés, les techniques de *Tandem Mass Tag* (TMT) couplé à la spectrométrie de masse ainsi que divers outils bio-informatiques ont été utilisées. Toutes les expériences en lien avec la spectrométrie de masse ont été effectuées par Marie-Soleil Gauthier et Benoît Coulombe (IRCM) tandis que l'analyse bio-informatique a été effectuée par Rachel Nadeau et Mathieu Adam-Lavallée (Université d'Ottawa).

2.7.1 Digestion Tryptique

Suite à l'homogénéisation des préparations neuromusculaires, 50 μg de chaque échantillon ont été utilisés pour les futures étapes. Également, dans le but de normaliser les échantillons, deux échantillons identiques comprenant la combinaison des extraits de l'ensemble des échantillons ont été préparés en combinant 2.5 μg de protéines des 20 échantillons utilisés. La préparation et la digestion de ces échantillons ont été effectuées en suivant les instructions du manufacturier « TMT-

11 plex ». Brièvement, les ponts disulfures ont été réduits dans 5 mM tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) pendant 1h à 55 °C. Les cystéines ont été alkylées dans 15 mM iodoacetamide pendant 30 min à TP dans le noir. Les protéines ont été précipitées dans l'acétone toute la nuit puis resuspendues dans le Triéthylammonium bicarbonate (TEAB). Finalement, les protéines ont été digérées toute la nuit à 37 °C avec de la Trypsin.

2.7.2 Marquage TMT

Le marquage TMT a été effectué sur les peptides de chaque échantillon individuel ainsi que dans les échantillons contrôles en suivant les instructions du fabricant. Les échantillons ont été distribués de manière aléatoire dans deux « 10-plex label sets » avec un échantillon contrôle. Le « *TMT 11-plex labeling reagents* » (0.8 mg) a été dissous dans 52 µL anhydrous acétonitrile (ACN). Chaque échantillon a été combiné avec son « *TMT 11-plex labeling reagents* » et incubé pendant 1h à température pièce. La réaction a été interrompue avec 5% hydroxylamine. Les échantillons ont par la suite été asséchés grâce à un aspirateur à haute vitesse (anglais : « *speed-vac* »). Les échantillons ont été dissous dans une solution de 5% acide formique, rassemblés dans 2 « 11-plex » et séparés en 10 fractions avec « *Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit* ».

2.7.3 Analyses LC-MS/MS

La technique de la quantification via marquage isobarique TMT permet d'analyser 10 échantillons biologiques ainsi que le contrôle dans une expérience de spectrométrie de masse. Les peptides ont été injectés dans une colonne C18 75 µm i.d. × 150 mm Self-Pack installés dans le système Easy-nLC II (Proxeon Biosystems). Le tampon utilisé pour la chromatographie est l'acide formique à 0.2% (tampon A) et une solution comprenant un ratio de 90% d'acétonitrile / 0.2% d'acide formique (tampon B). Les peptides ont été élués dans deux gradients à deux pentes à un débit de 250 nL / min. Le Tampon B est le premier à augmenter de 1 à 40% en 100 minutes et puis de 40 à 85% en 10 minutes. Le système HPLC a été couplé au spectromètre de masse Orbitrap Fusion (Thermo Scientific) à travers une source ionique « *Nanospray Flex* ». Le *Nanospray* et le « *S-lens voltage* » ont été respectivement mis à 1.3-1.8 kV et 60 V. La température de capillaires a été mise à 250 °C. Une analyse du spectre complet MS (m/z 360 – 1560) a été acquise dans Orbitrap avec une résolution de 120,000 en utilisant comme valeur cible 3e5. Les 25 ions peptidiques les plus intenses ont été fragmentés dans la cellule de collision HCD et analysés dans le piège à ions

linéaire avec une valeur cible à $2e4$ et une énergie de collision normalisée à 28. Les ions cibles sélectionnés pour la fragmentation ont été exclus pendant 20 secondes

2.7.4 Identification des Protéines

Un fichier Rhermo RAW a été convertie en format mzML utilisant msConvert (Adusumilli and Mallick 2017) provenant de « *ProteoWizard toolkit* » (Chambers, Maclean et al. 2012). Le fichier généré par LC-MS/MS mzML contient les séquences protéiques. Une recherche de ces séquences en utilisant l'algorithme Comet (Eng, Jahan et al. 2013) dans la base de données a été effectuée dans les protéines murines « Swiss-Prot » révisées d'UnitProt (téléchargée le 01-04-2019). La recherche a été exécutée avec une tolérance de masse des ions précurseurs de 20 ppm, ne considérant que les peptides entièrement tryptiques et avec un maximum de 2 clivages. Par la suite, la carbamidométhylation des cystéines et des modifications des lysines par le TMT11 a été considérée comme des modifications fixes et l'oxydation de méthionine comme une modification variable. La confirmation de l'identité des peptides et des protéines a été évaluée via PeptideProphet (Keller, Nesvizhskii et al. 2002) et ProteinProphet (Nesvizhskii, Keller et al. 2003). L'identification est considérée fiable a avec un taux de « *False Discovery Rate* » inférieur à 1%.

2.7.5 Quantification des Protéines

Les peptides et les protéines ont été quantifiés en utilisant le logiciel Libra provenant de Trans-Proteomic Pipeline qui extrait l'intensité des ions des rapporteurs du TMT (Deutsch, Mendoza et al. 2015). Les intensités des ions rapporteurs individuels ont été normalisées pour ajuster l'intensité totale d'un canal TMT à l'intensité totale moyenne sur les 11 canaux TMT (Plubell, Wilmarth et al. 2017). Les intensités des ions rapporteurs ont ensuite été normalisées par la somme des intensités des ions rapporteurs dans le canal TMT contenant l'échantillon contrôle, afin de permettre une comparaison des valeurs de quantification des protéines entre les expériences TMT. Les valeurs de quantification des protéines dans un canal TMT donné ont été définies comme l'intensité moyenne de ses spectres correspondants dans le canal.

2.7.6 Analyses Bio-informatiques

L'analyse statistique de l'expression différentielle des protéines ont été performés avec une ANOVA mixte utilisant le « *nlme R package* » (Pinheiro, Bates et al.) ainsi que le « *emmeans package* » pour les tests post-hoc. Le type de muscle (EOM et EDL) ont été considérés la variable

intra-sujet tandis que le phénotype de la souris (WT et SOD1) la variable entre le sujet. Les « *p-value* » ont été corrigés en utilisant le test pour les hypothèses multiples Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg 1995). Un test post-hoc Tukey a été performé sur les FDR et les « *p-value* » pour déterminer les groupes d'importance. Les protéines significatives possèdent un intervalle de confiance de 95% ont été reporté.

L'analyse bio-informatiques a permis de déterminer spécifiquement le protéome des différentes conditions. L'ensemble des protéines dans chacune des conditions ont été représentées dans un graphique de type volcano plot via le logiciel Perseus. L'outil InteractiVenn (Heberle, Meirelles et al. 2015) a permis de regrouper dans un diagramme de Venn les protéines différentes statistiquement selon la ou les conditions correspondantes.

2.7.7 Analyse des fonctions

Dans le but d'investiguer les différentes cascades moléculaires et fonctions cellulaires, l'utilisation de quelques outils bio-informatiques ont permis d'effectuer une analyse approfondie. Les *GOENRICHISSEMENT* ont été déterminé via GOrilla (Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool) (Eden, Navon et al. 2009). Les enrichissements possédant un $FDR \leq 0.05$ (*false discovery rate*) ont été gardé. L'interaction protéine-protéine de protéines dans certaines conditions ont été déterminé grâce au logiciel STRING v11.0 (Szklarczyk, Gable et al. 2019). Certaines fonctions, localisations cellulaires, ainsi que caractéristiques spécifiques (séquence transmembranaire) ont été déterminées grâce à *Uniprot* (UniProt Consortium 2018). L'analyse des fonctions et des caractéristiques ont été effectuée entre le 14 février 2020 et le 7 mars 2020.

2.8 Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur type de la moyenne. Le nombre d'animaux est identifié comme N et le nombre de JNMs ou de CSPs est représenté par n. Pour les analyses morphologiques, comme publié précédemment (Tremblay et al., 2017), afin de comparer les différents pourcentages, puisque les résultats ne suivent pas une distribution Gaussian, un modèle linéaire généralisé, « anglais : *generalized linear model* » (GLM) utilisant une distribution logistique a été utilisé. Pour les réponses calciques des CSPs induites suivant l'application locale d'agoniste, un t tests non païré a été performé pour comparer les résultats de deux conditions différentes. Tous les résultats possédant un intervalle de confiance de 95% sont considérés significatifs ($p \leq 0.05$)

Chapitre 3 - Résultats

Pour investiguer le rôle des CSPs à la JNM des muscles extraoculaires ainsi que dans leur implication dans la résistance de ce muscle à la dénervation dans la SLA, une analyse morphologique extensive des JNMs a été effectuée dans un modèle murin afin de déterminer si des altérations étaient observées. Par la suite, l'application locale d'agoniste couplé à l'imagerie calcique a été utilisée afin de déterminer si les CSPs décodent de manière adéquate leur environnement synaptique. Finalement, une analyse de protéomique comparative entre les muscles extraoculaires et l'*extensor digitorum longus* au stade symptomatique de la maladie a été effectuée afin de déterminer les cascades moléculaires potentielles qui pourraient expliquer ces différences dans la résistance à la maladie.

3.1 Propriétés morphologiques des JNMs des muscles extraoculaires

La SLA est caractérisée par la dénervation progressive des JNMs des muscles striés, un processus neurodégénératif qui varie selon le type d'unité motrice. Cependant, certains muscles, dont les muscles extraoculaires, sont beaucoup plus résistants à cette dénervation. Deux scénarios menant à cette résistance peuvent émerger. D'une part (1), les muscles extraoculaires, possèderaient des mécanismes intrinsèques adaptés leur permettant de résister à cette dénervation, ou (2) les muscles extraoculaires seraient tout simplement touchés plus tardivement dans la maladie. Ainsi, pour investiguer ces différentes possibilités, une analyse morphologique des JNMs des muscles extraoculaires est primordiale. Nous prévoyons qu'à un stade tardif de la maladie, dû aux mécanismes intrinsèques, la morphologie des JNMs sera conservée.

Afin d'investiguer les altérations morphologiques des JNMs des muscles extraoculaires, il a été nécessaire d'isoler les préparations neuromusculaires à un stade avancé de la maladie, soit, lorsque les souris SOD1^{G37R} ont perdu entre 20%-30% de leur poids maximal et lorsqu'une paralysie prononcée des membres inférieurs est observée, soit, en moyenne, vers 530 jours postnatals. Dans la figure 3.1, on peut observer les différents éléments de la JNM de souris sauvage (WT) ainsi que des JNMs de souris porteuses de la mutation (SOD1^{G37R}) au stade symptomatique tardif de la SLA. Globalement, aucune différence morphologique entre les souris WT et SOD1^{G37R} à un stade très tardif de la SLA est observée.

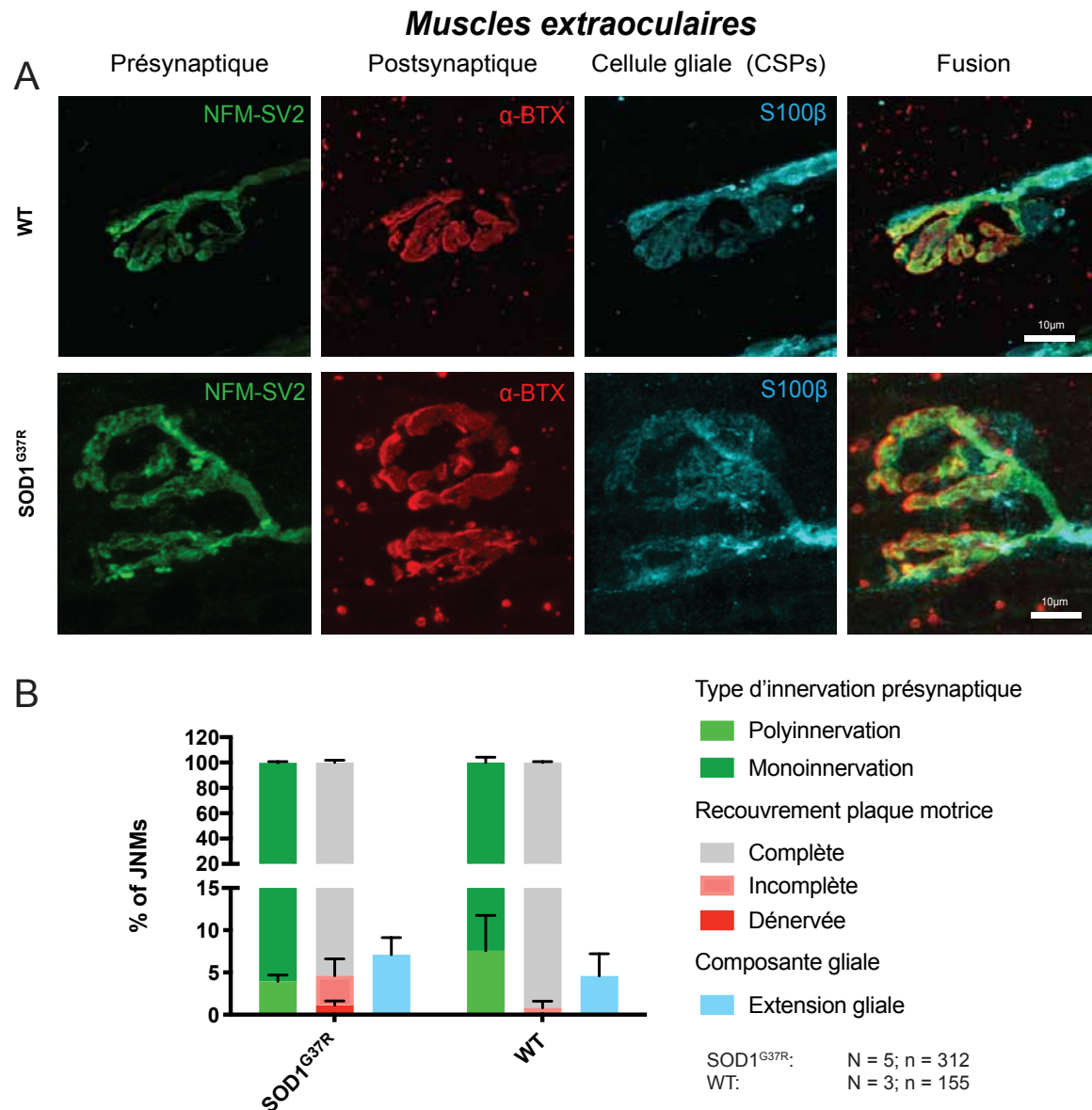


Figure 3.1 Morphologie non atteinte des JNMs dans les muscles extraoculaires au stade symptomatique tardif de la SLAt

(A) Images aux confocales des différents éléments de la JNMs des muscles extraoculaires chez la souris sauvage (WT) et chez la souris mutée (SOD1^{G37R}) au stade symptomatique (P530). Les récepteurs postsynaptiques ont été marqués en rouge à l'aide de la toxine α -bungarotoxine, la terminaison axonale a été marquée en vert grâce aux anticorps NFM et SV2 et l'élément glial a été marqué en cyan grâce à l'anticorps S100 β . (B) Histogramme le pourcentage moyen \pm SEM des JNMs qui sont mono (vert pâle) ou polyinnervé (vert foncé), possédant un recouvrement de la plaque motrice complet (gris), incomplet (rose) ou entièrement dénervé (rouge) ainsi que la présence d'extension gliale (bleu) des CSPs. L'échelle : 10 μ m. N = nombre de souris. n = nombre de JNMs

Tableau 3.1 Analyse morphologique des JNMs des muscles extraoculaires

	Élément présynaptique		Élément postsynaptique					Élément Glial	
	Monoinnervation	Polyinnervation	Récepteurs ectopiques (um)		Recouvrement plaque motrice			Extension CSPs (avec prolongement axonal)	Extension terminale (sans prolongement axonal)
			5	10	Complet	Partiel	Dénervé		
WT	92.44 % ± 0.89 %	7.56 % ± 4.19%	8.3 ± 3.1 %	1.6 ± 0.68 %	99.21% ± 0.79%	0.79% ± 0.79%		4.6 % ± 2.6 %	
SOD1 ^{G37R}	95.83 % ± 0.89%	3.95 % ± 0.75%	9.1 ± 3.2 %	0.60 ± 0.60 %	95.4% ± 1.8%	3.4 % ± 2.0%	1.14 % ± 0.50	7.1 % ± 2.0%	

Analyse morphologique des JNMs des éléments présynaptiques, postsynaptiques et gliaux des JNMs des muscles extraoculaires chez la souris sauvage (WT : N = 3, n = 155) et chez la souris mutée (SOD1G37R : N = 5, n = 312) au stade symptomatique (P530) représenté en pourcentages moyens ± SEM. Valeur non disponible en gris.

Une analyse plus exhaustive des différents éléments de la JNM est illustrée dans l'histogramme de la figure 3.1B dont les valeurs de cette analyse se trouvent dans le tableau précédent (tableau 3.1). Dans cet histogramme, trois éléments principaux ont été analysés : l'innervation des JNMs (vert : monoinnervation ou polyinnervation), le recouvrement de la plaque motrice par la terminaison axonale (gris : recouvrement complet, rose : recouvrement partiel, rouge : plaque motrice dénervée) ainsi que la présence d'extension gliale des CSPs.

Dans les sections suivantes (3.1.1 à 3.1.3), les différents éléments mentionnés plus haut seront analysés plus profondément. Ces analyses morphologiques de la JNM sont effectuées en utilisant les critères d'analyse publié précédemment par notre laboratoire et qui figurent dans le tableau 2.1 de la section Matériel et Méthode (Arbour, Tremblay et al. 2015, Tremblay, Martineau et al. 2017, Martineau, Di Polo et al. 2018). Sommairement, via les images obtenues par microscopie confocal, l'innervation sera évaluée en regardant la provenance et le nombre de terminaison axonal innervant la plaque motrice. Le recouvrement de la plaque motrice sera déterminé en évaluant le recouvrement de cette dernière avec la terminaison axonale : totalement recouverte (complète), partiellement recouverte (partielle) ou exempt de terminaison axonale (dénervée). Finalement, durant les processus de réparation de la JNM, les CSPs génèrent des processus à partir de la plaque motrice dénervée vers une plaque innervée adjacente. Ces extensions gliales exempt (extension terminale) ou contenant une terminaison axonale (extension axonale) ont été comptabilisées.

3.1.1 Innervation des JNMs des muscles extraoculaires

Le type d'innervation des JNMs est un élément primordial à investiguer dans un premier temps. Sachant que les muscles extraoculaires peuvent être naturellement polyinnervés (1) observe-t-on une différence dans le ratio monoinnervation / polyinnervation entre les JNMs des souris WT ou SOD1^{G37R}? Sachant que lors des processus de dénervation, la terminaison axonale des JNMs innervées adjacentes vont faire des extensions pour aller innerver les JNMs dénervées (2) est-il possible d'observer cet élément chez les JNMs des muscles extraoculaires? Dans les muscles extraoculaires WT, on observe une polyinnervation de $7.6\% \pm 4.2\%$ ainsi qu'une monoinnervation de $92.4\% \pm 4.2\%$ des JNMs ($N = 3$; $n = 155$), similairement aux JNMs des muscles extraoculaires des souris SOD1^{G37R}, dans lesquelles on observe respectivement $3.95\% \pm 0.75\%$ et $95.83\% \pm 0.89\%$ de polyinnervation et de monoinnervation ($N = 5$; $n = 312$). Ainsi, on n'observe aucune différence dans le ratio d'innervation des JNM et, tout comme la souris WT, la polyinnervation semble être davantage axonale plutôt que provenant d'une plaque motrice adjacente (données non présentées).

3.1.2 Innervation de la plaque motrice des JNMs des muscles extraoculaires

Un second élément primordial à investiguer est l'état d'innervation de la JNM reflété par le recouvrement de la plaque motrice par la terminaison axonale. Aussi représentatif de l'état de la JNM, nous avons analysé la distribution et le regroupement des récepteurs nicotiniques postsynaptiques. Est-il possible dans un premier temps d'observer le phénomène de dénervation et/ou la présence de récepteur ectopique qui sont deux éléments observés dans la SLA ou lors du vieillissement normal (Tremblay, Martineau et al. 2017)? Tout comme pour l'innervation axonale des JNMs, on n'observe aucune différence entre les JNMs WT et SOD1^{G37R} au niveau des altérations postsynaptiques. En effet, chez les souris WT, $99.21\% \pm 0.79\%$ et $0.79\% \pm 0.79\%$ des plaques motrices des JNMs sont respectivement complètement innervées ou partiellement innervées ($N = 3$; $n = 155$). Similairement, chez les souris SOD1^{G37R}, on observe $95.4\% \pm 1.8\%$, $3.4\% \pm 2.0\%$ ainsi que de $1.1\% \pm 0.5\%$ de JNM ($N = 5$; $n = 312$) dont la plaque motrice est respectivement complètement recouverte, partiellement innervée ou complètement dénervée.

Au sujet des récepteurs ectopiques, soit, la présence d'un regroupement de récepteurs postsynaptiques distincts à une distance de 5 à 10 μm du regroupement principal, peut être observée

dans les JNMs dans la SLA et lors du vieillissement (Arbour, Tremblay et al. 2015, Tremblay, Martineau et al. 2017). Chez les souris WT, $8.3 \% \pm 3.1 \%$ ainsi que $1.6 \% \pm 0.68 \%$ ($N = 3$; $n = 155$) des JNMs possédaient respectivement des récepteurs ectopiques, valeur similaire chez les JNMs de SOD1, qui possèdent respectivement $9.1 \% \pm 3.2 \%$ et $0.60 \% \pm 0.60 \%$ ($N = 5$; $n = 312$). En ce sens, aucune différence dans l'organisation des récepteurs postsynaptiques ainsi que dans le recouvrement de plaque motrice n'a été observé entre les souris mutées et leurs contrôles.

3.1.3 Morphologie gliale des JNMs des muscles extraoculaires

Le dernier élément morphologique primordial investigué est la présence d'extension gliale qui assure les processus de réinnervation lors de dénervation de la JNM. Plusieurs éléments peuvent en découler : dans un premier temps, lors de la dénervation des JNMs, les CSPs sont-elles en mesure de faire des extensions afin de promouvoir la réinnervation? Bien que ces extensions soient présentes, semblent-elles organisées et dirigées vers une JNM innervée adjacente ou sont-elles désorganisées comme observées précédemment (Arbour, Tremblay et al. 2015, Martineau, Arbour et al. in prep)? Dans les JNMs des muscles extraoculaires, aucune extension terminale n'a été observée ni chez les WT, ni chez les SOD1. Très peu d'extensions axonales ont été observées, soit $4.6 \% \pm 2.6 \%$ chez les WT, valeur similaire chez les SOD1 dans lesquels $7.1 \% \pm 2.0\%$ de JNM. Ainsi, malgré l'âge avancé de la maladie, aucun processus dégénératif ainsi que de réparation a été observé dans le muscle extraoculaire suggérant des JNMs stables même durant un stade avancé de la SLA.

En résumé, le maintien de la morphologie des différents éléments de la JNM à un stade tardif de la SLA dans les muscles extraoculaires est observé. Cependant, ce phénomène est-il dû à une atteinte plus tardive de ces muscles ou serait-il dû à la capacité des différents éléments de la JNM de maintenir leur fonction malgré les altérations moléculaires engendrées par la maladie?

3.2 Analyse de l'activité des CSPs dans les JNMs des muscles extraoculaires

Afin d'investiguer la résistance particulière des JNMs des muscles extraoculaires au phénomène de dénervation, il est primordial d'investiguer la capacité d'un élément en particulier, la CSP, de décoder et de répondre à l'environnement synaptique. Deux neurotransmetteurs sont relâchés au cours de la transmission synaptique et vont diffuser dans la fente synaptique : l'ATP

ainsi que l'ACh. Ceux-ci vont se lier entre autres aux récepteurs métabotropiques présents sur les CSPs, soit, les récepteurs purinergiques P2Y, à l'adénosine A1, ainsi qu'au récepteur muscarinique.

Une hyper sensibilité ainsi qu'une contribution muscarinique plus élevées dans les CSPs des muscles vulnérables à la maladie a été observée, et ceci, bien avant la dénervation des JNMs (Arbour, Tremblay et al. 2015, Martineau, Arbour et al. in prep). En ce sens, puisqu'une signalisation élevée muscarinique est inadéquate pour les processus de réparation (Son, Trachtenberg et al. 1996), est-ce que les CSPs des JNMs des muscles extraoculaires auraient une activation muscarinique normale ce qui expliquerait le maintien de la morphologie des JNMs? Pour ce faire, puisque l'excitabilité des CSPs est dépendante du calcium, l'activité calcique a été analysée en utilisant un indicateur calcique fluorescent, le Fluo-4AM. Les CSPs ont été activées par applications locales d'agonistes des récepteurs muscariniques et purinergiques, des récepteurs connus pour réguler leur activation durant la transmission synaptique (Robitaille 1995, Robitaille, Jahromi et al. 1997).

3.2.1 L'activation purinergique des CSPs des JNMs des muscles extraoculaires demeure inchangée

Dans la SLA, est-ce que la sensibilité à l'ATP est différente entre les CSPs des souris WT et des souris SOD1^{G37R}? Pour se faire, une pipette de verre contenant une solution d'ATP (10µM) a été approchée des CSPs. La solution, préalablement insérée, a été relâchée ce qui a induit des changements calciques internes qui sont mesurés grâce au Fluo4-AM. Dans les CSPs du *soleus* (muscles vulnérables) aucune différence dans la réponse maximale entre les CSPs des souris WT et SOD1^{G37R} est observé, soit respectivement de $576.1 \% \pm 38.7\% \Delta F/F$ (N = 8, n = 22) et $625.2 \% \pm 24.1\% \Delta F/F$ (N = 6; n = 29) (Arbour et al., 2015; Figure 3.2A-C). Les conditions expérimentales utilisées précédemment ont été reproduites, mais cette fois-ci, au niveau des CSPs des muscles extraoculaires (Figure 7D-7F). Suite à l'application locale d'ATP, similairement aux muscles vulnérables, aucune différence dans la réponse maximale entre le WT ($255.4 \pm 21.0\% \Delta F/F$; N = 6; n = 36) et le SOD1 ($232.9 \pm 21.4 \% \Delta F/F$; N = 6; n = 22). De manière intéressante, une différence dans le niveau maximal à l'ATP est observée entre le *soleus* et l'EOM. En effet, la réponse des CSPs maximale à l'ATP est supérieure au niveau du *soleus* comparativement au EOM chez le WT et chez le SOD1^{G37R}. Des différences dans l'activation des CSPs selon les différents types d'UM ont été rapportées précédemment et pourraient expliquer cette différence observée (Rousse and

Robitaille 2006). Somme tout, l'activation des CSPs des muscles extraoculaires par les récepteurs purinergiques n'est pas altéré.

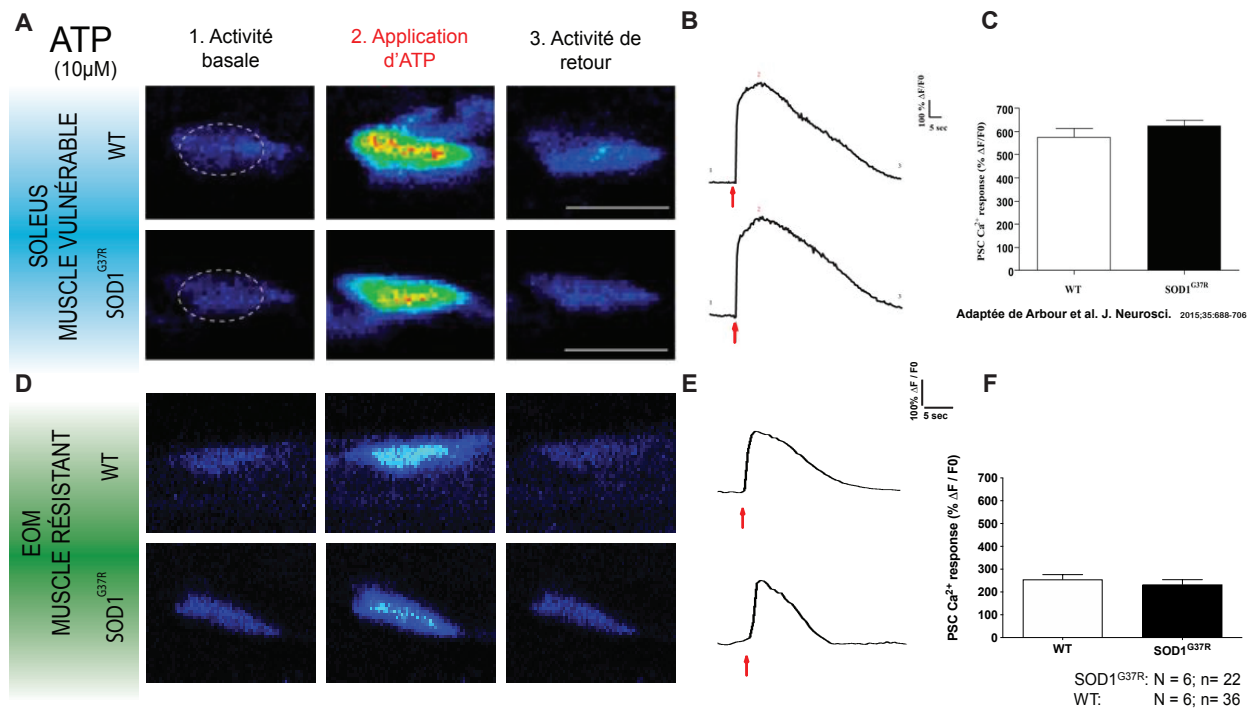


Figure 3.2 Sensibilité des CSPs des JNMs à l'ATP dans les muscles extraoculaires au stade présymptomatique (P380) de la SLA

(A-C) Sensitivité des CSPs dans le soleus. Adaptée de Arbour et al., 2015. (D-F) Sensitivité des CSPs dans le muscle extraoculaire. (A, D) Images aux confocales utilisant une fausse couleur d'une CSP et des changements de Ca^{2+} à l'état basal, suite à l'application locale d'ATP et lors du retour au niveau basal. Panneau supérieur illustre une CSP WT tandis que le panneau inférieur illustre une CSP SOD1^{G37R}. (B, E) Graphique du changement de fluorescence ($\% \Delta F / F_0$) de la CSP correspondante. (C, F) Histogramme des pourcentages moyens des différences maximales de fluorescentes ($\% \Delta F_{\text{max}} / F_0$) \pm SEM. L'échelle : 10 µm. N = nombre de souris. n = nombre de JNMs. Panneau A-C a été adapté de Arbour et al., J. Neuroscience (2015). Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY).

3.2.2 L'activation muscarinique des CSPs à la muscarine demeure inchangée

Dans la SLA, sachant que l'activation muscarinique des CSPs est anormalement élevée dans les muscles vulnérable (Figure 3.3A-C; Arbour et al., (2015)) et que la signalisation muscarinique est importante pour la balance réparation et maintien de la JNM (Son, Trachtenberg et al. 1996), qu'elle est l'activation muscarinique des CSPs dans les muscles résistants dont les JNMs possédant une morphologie stable? Comme publié précédemment ainsi qu'inséré dans la figure suivante, Arbour et al. (2015) ont démontré une plus grande sensibilité des CSPs du *soleus* (muscle vulnérable) à la muscarine des souris SOD1^{G37R} (Figure 3.3A-C). En effet, une augmentation de la réponse maximale entre les CSPs des souris WT comparativement aux CSPs

des SOD1^{G37R}, soit respectivement de 139.5 % ± 20.0% ΔF/F (N = 9, n = 32) et 248.6 % ± 21.5 % ΔF/F (N = 10; n = 52). Contrairement aux muscles vulnérables, l'application de muscarine (20 uM) localement au niveau des CSPs des muscles extraoculaires, a induit des réponses similaires entre les CSPs des souris SOD1 (121.1 % ± 14.5 % ΔF/F; N=6; n=22) et WT (124.8 % ± 17.7% ΔF/F; N=6; n=21). Ceci démontre que, contrairement aux muscles vulnérables, les CSPs des JNMs des muscles extraoculaires possèdent une sensibilité normale (c.a.d. niveau de réponse similaire que retrouvé chez les WT) aux différents agonistes suggérant ainsi une fonction gliale normale à la JNM des muscles extraoculaires.

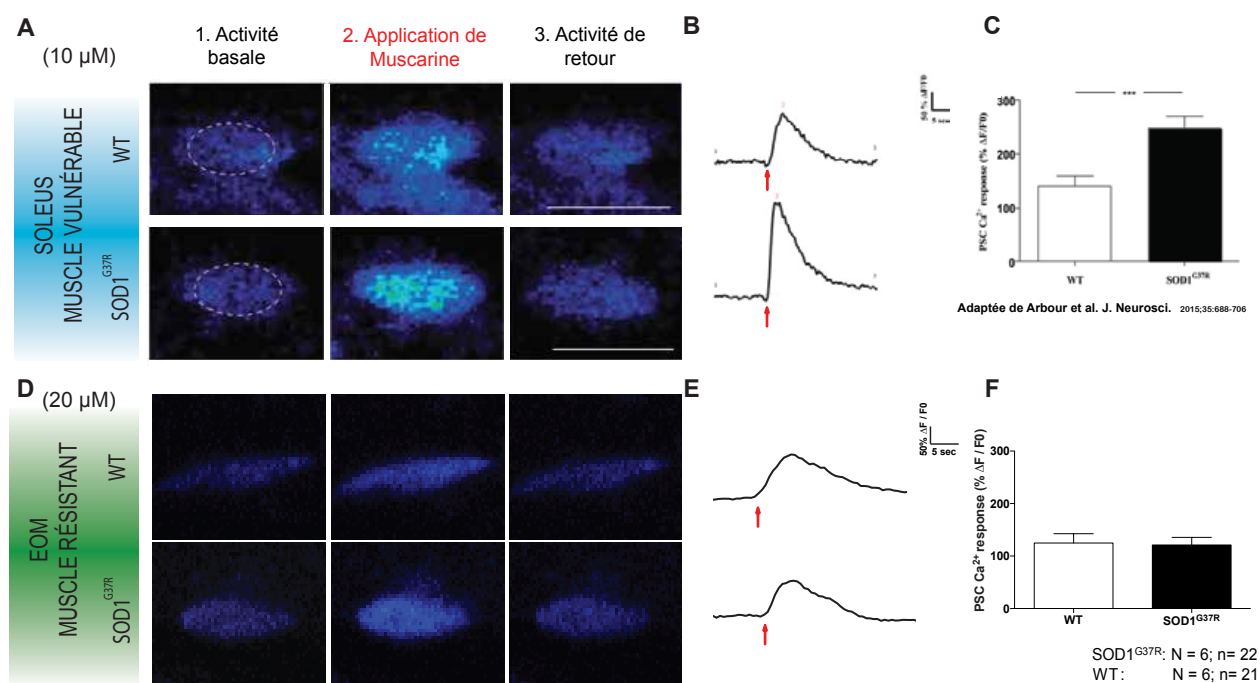


Figure 3.3 Sensibilité des CSPs des JNMs à la muscarine dans les muscles extraoculaires au stade présymptomatique (P380) de la SLA

(A-C) Sensitivité des CSPs dans le soleus. Adaptée de Arbour et al., 2015. (D-F) Sensitivité des CSPs dans le muscle extraoculaire. (A, D) Images aux confocales d'une CSP et des changements de Ca²⁺ à l'état basal, suite à l'application locale de muscarine et lors du retour au niveau basal. Panneau supérieur illustre une CSP WT tandis que le panneau inférieur illustre une CSP SOD1^{G37R}. (B, E) Graphique du changement du changement de fluorescence (%ΔF / F₀) de la CSP correspondante. (C, F) Histogramme des pourcentages moyens des différences maximales de fluorescentes (%ΔFmax / F₀) ± SEM. L'échelle : 10 μm. N = nombre de souris. n = nombre de JNMs. Panneau A-C a été adapté de Arbour et al., J. Neuroscience (2015). Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY).

3.3 Analyse comparative d'expression de protéines dans entre les JNMs vulnérables et résistantes dans la SLA

La morphologie des JNMs ainsi que la sensibilité des CSPs ne sont pas altérées dans les muscles extraoculaires dans la SLA. Est-ce que le maintien de ces phénomènes est dû à des propriétés intrinsèques des CSPs qui se refléteraient dans le profil protéiques des muscles extraoculaires? Pour ce faire, les protéines des préparations neuromusculaires des muscles les plus résistants (muscles extraoculaires) et des plus vulnérables (*Extensor Digitorum Longus*) ont été isolées de les mêmes souris SOD1^{G37R} symptomatiques, présentant une perte des réflexes des membres inférieurs ainsi qu'une diminution de plus de 10% de masse corporelle. Les mêmes préparations neuromusculaires ont été isolées chez des souris saines, n'exprimant pas la mutation (WT), possédant un âge similaire (Figure 3.4, Tableau 3.2). Comme illustré dans le tableau suivant (Tableau 3.2) les EOMs des souris SOD1^{G37R} et WT gauche et droit des quatre rectus ont été isolés puis mis ensemble afin d'extraire les protéines dans le but d'assurer l'obtention de la quantité minimale de protéine nécessaire pour les expériences de spectrométrie de masse. L'extraction des protéines du EDL proviennent uniquement du muscle droit suite au partage des souris au sein des membres du laboratoire. Comme illustré dans la figure suivante (Figure 3.4), un TAG fluorescent a été attribué à chacun des échantillons et une spectrométrie de masse a été effectuée. L'expression des protéines ont été normalisés puis comparées à l'ensemble des échantillons. Une ANOVA mixte ainsi qu'un test post-hoc Turkey ont été effectués afin de déterminer les différences d'expression protéique.

Tableau 3.2 Préparations neuromusculaires isolées

		EOM								EDL	
		G				D				G	D
		N	S	I	M	L	S	I	M	L	
WT	5										
SOD1 ^{G37R}	5										

Préparations neuromusculaires isolées par chaque animal individuellement. Chez les souris WT, au total, N = 5 souris ont été utilisées. Afin de maximiser la quantité de protéine extraite, les 4 muscles extraoculaires gauche et droit (S : supérieur, I : inférieur, M : médial, L : latéral) ainsi que les EDL gauche et droite ont été utilisé puis regrouper respectivement lors de l'extraction protéique. Chez les souris SOD1^{G37R}, au total, l'extraction des préparations neuromusculaires de N = 5 souris des muscles extraoculaires ont été fait similairement avec les 4 rectus gauche et droit (vert). Cependant, uniquement l'EDL droit (vert) a pu être isolé

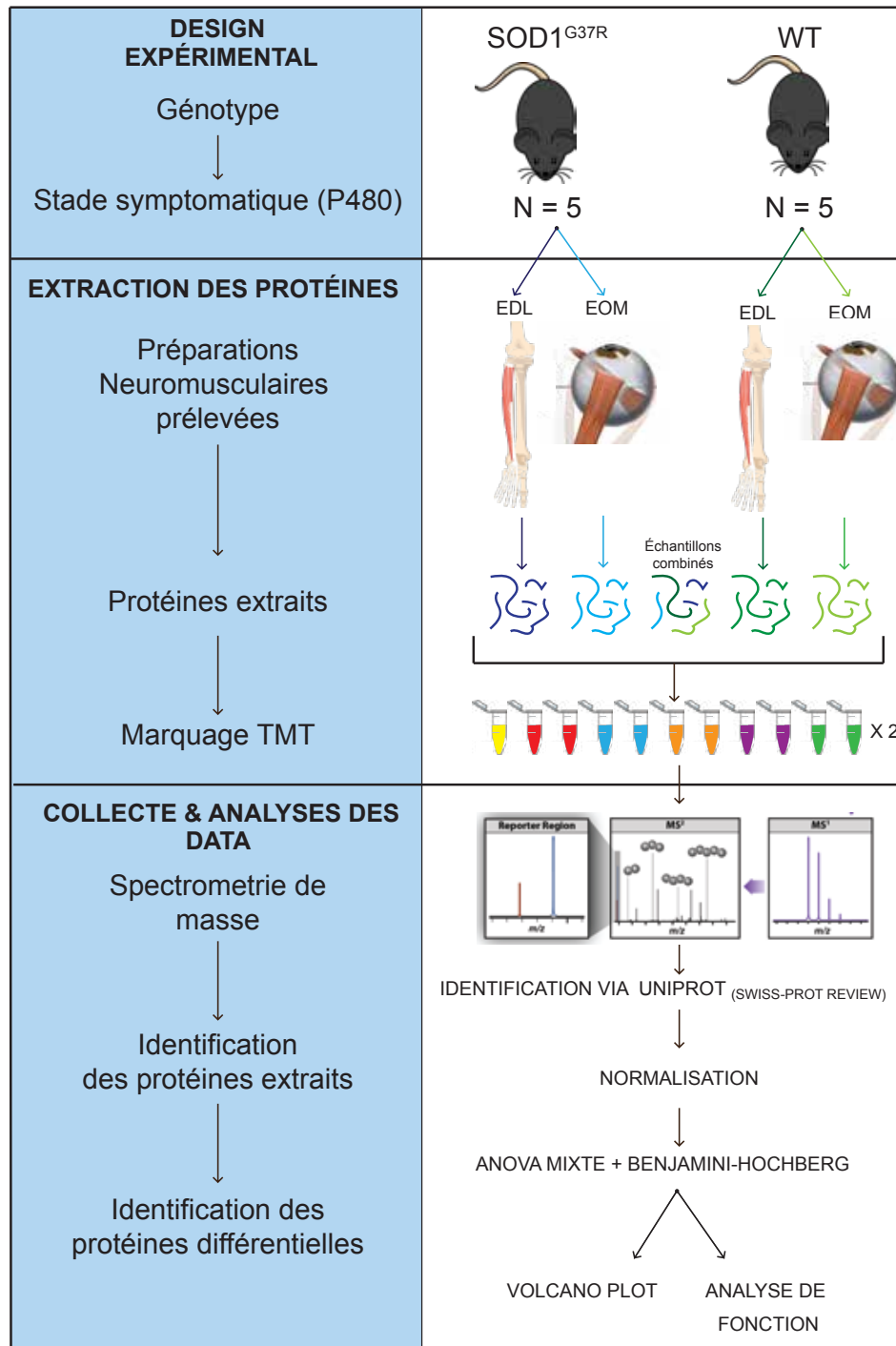


Figure 3.4 Design expérimental permettant la comparaison d'expression protéique dans les muscles extraoculaires et EDL dans l'ALS.

Les préparations neuromusculaires des muscles extraoculaires et EDL ont été isolées au stade symptomatique des souris SOD1^{G37R} ainsi que des WT d'âge similaire. Les protéines des échantillons ont été extraites puis marquées via un TAG fluorescent spécifique à l'échantillon. Les protéines des échantillons ont par la suite été identifiées puis analysées via spectrométrie de masse en utilisant la base de données de « Swiss-pro » révisé d'Uniprot, puis des étapes de normalisations. Une anova-mixte ainsi que le procédure Benjamini-Hochberg pour les tests à plusieurs hypothèses ont permis d'identifier les expressions différentielles entre les conditions expérimentales. Illustration de la spectrométrie de masse obtenue de A.J. Bureta (2010) CC BY-SA 3.0

3.3.1 Analyse protéomique comparative exhaustive

3.3.1.1 Distribution intracellulaire des protéines identifiées

Dans un premier temps, une analyse exhaustive des protéines identifiées va permettre d'avoir une vision globale des protéines extraites et de confirmer si le protocole d'extraction utilisé a permis de favoriser l'isolement des protéines transmembranaires synaptique. Comme illustré dans la Figure 3.5, il a été possible d'isoler et d'identifier plus de 2758 protéines dont 2282 étaient différentes significativement entre les différentes conditions expérimentales. De plus, le protocole d'extraction protéique spécifique a permis d'isoler non seulement 481 protéines transmembranaires (Figure 3.5. TM) mais également plusieurs protéines localisées dans divers organelles cellulaires telles des protéines nucléaires, mitochondriales et provenant du réticulum endoplasmique, du Golgi ainsi que dans le cytoplasme. Des protéines se trouvant au niveau axonal (présynaptique, postsynaptique, vésicule synaptique, axone, etc.) et musculaires (M band, complexe de myosine musculaire, sarcomère, etc.) ont été identifiées (Figure 3.5B) supportant ainsi notre approche expérimentale pour isoler les cascades moléculaires spécifiques à cette préparation neuromusculaire.

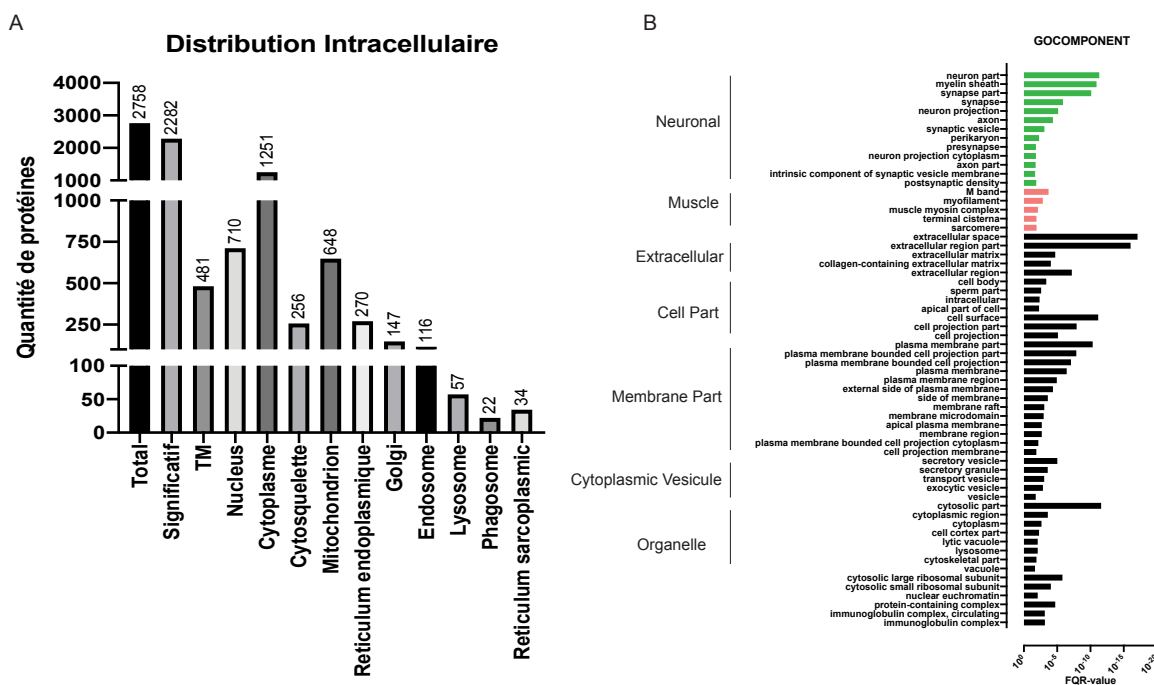


Figure 3.5 Description exhaustive des protéines extraites.

(A) Histogramme illustrant la distribution intracellulaire des protéines identifiées à partir de la base de données uniprot.
 (B) Histogramme représentant les différents enrichissements protéiques dans un compartiment spécifique identifié via GOrilla..

3.3.1.2 Protéines identifiées reliées à la SLA

Dans un second temps, avons-nous identifié des protéines dont une contribution dans la SLA a été déjà reportée? Comme illustré dans la figure suivante (Figure 3.6), quelques protéines possédant une implication dans la pathogenèse de la SLA ont été identifiées. Entre autres, les protéines en lien avec le métabolisme d'ARN tel *TARDBP*, *FUS* et *ATX2*, les protéines en lien avec le transport ainsi que la dégradation des protéines telle *UBQLN2*, *SQSTM1*, *OPTIN*, *VCP* ainsi que des protéines reliées avec le cytosquelette et le dynamique axonal telle que *DCTN1*, *TUBA4A* et *PRPH* sont présentes dans le protéome de nos échantillons. Malgré tout, quelques protéines telle *ANG*, *C9ORF72*, *TBKI* n'ont malheureusement pas été identifiés (hachuré). Ainsi, existe-t-il des différences d'expressions de ces protéines à des conditions spécifiques?

Brièvement, dans les protéines identifiées, plusieurs différences d'expressions sont significativement distinctes entre les conditions (colonne corrected-pvalue (SOD vs WT) ou (EOM vs EDL)). Tout d'abord, la majorité des protéines semblent se distinguer dû à des différences intrinsèques musculaires (EOM vs EDL). Chez les WT, les protéines en lien avec le métabolisme ARN, le transport et la dégradation des protéines sont plus exprimées dans l'EOM que dans l'EDL. Les exigences énergétiques plus élevées du EOM en comparaison du EDL pourraient expliquer cette distinction chez le WT. De manière intéressante, ces différences sont abolies chez les SOD1 entre les muscles vulnérables EDL et résistants EOM au stade symptomatique dû à une augmentation de l'expression de ces protéines dans les muscles vulnérables.

Par ailleurs, 4 protéines se distinguent entre les WT et SOD1 symptomatique (corrected-pvalue (SOD vs WT) < 0.05 [vert]). En effet, les protéines Ataxin-2, importante pour le métabolisme d'ARN ainsi que certaines protéines reliées aux cytosquelettes et aux dynamiques axonales telle Dynactin subunit 1, Profilin 1 et Tubulin alpha-4A chain sont augmentées spécifiquement au EDL SOD1 symptomatique versus WT. Ces différences ne sont pas observées dans les muscles résistants EOM. Une investigation plus approfondie est requise. Somme tout, des altérations des protéines dont l'implication dans la SLA semble toucher plus spécifiquement les muscles vulnérables que les muscles résistants sont reportées. De manière intéressante, une différence d'expression est observée au niveau de la protéine SOD1. Une augmentation de la SOD1 est observée entre les différents muscles SOD et les WT, ce qui concorde avec notre modèle utilisé qui surexprime la protéine mutée (Wong, Pardo et al. 1995). Cependant, SOD1 est davantage

exprimé dans les muscles vulnérables que les muscles résistants. Ceci pourrait refléter dès le début une diminution de vulnérabilité des EOMs et une atteinte différentielle à l'ensemble des mécanismes pathophysiologiques discutés précédemment (section 1.2.3.5).

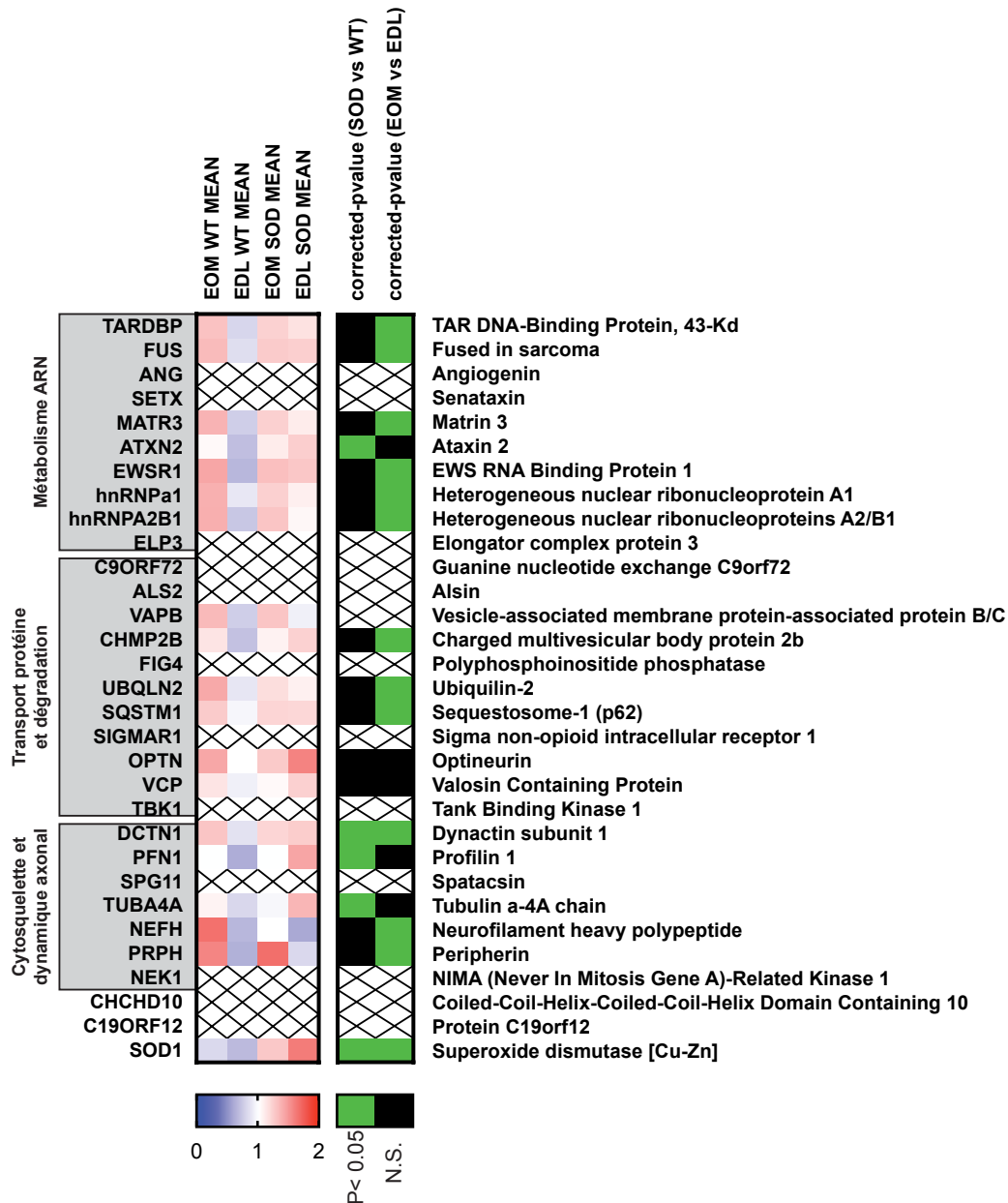


Figure 3.6 Protéines impliquées dans la SLA retrouvées dans la protéomique. Protéines organisées selon leur fonction impliquées dans la SLA. Chaque protéine est identifiée par le nom de leur gènes, accompagnée par un heat-map illustrant leur expression dans les différentes conditions ainsi que les p-value obtenu par l'anova mixte comparant le type génotype (SOD1 vs WT) ou le type cellulaire (EOM vs EDL) (vert p-value < 0.05; noir p-value > 0.05). Les protéines non détectées par la protéomique sont hachurées. La liste de protéine a été obtenue de (Mejzini, Flynn et al. 2019).

3.3.1.3 Les différences d'expression protéiques

L'ensemble des protéines différenciellement exprimées se retrouve dans la figure suivante (Figure 3.7). Dans la figure 3.7, un « *heat-map* » des valeurs d'expression de toutes les protéines individuelles de chacun des échantillons a été généré. Les échantillons ont été regroupés en fonction du profil d'expression globale et il est possible d'observer le regroupement des échantillons d'une même condition : ceci démontrant ainsi une ressemblance dans le profil d'expression des échantillons d'un même groupe (Figure 3.7A). Un diagramme de Venn a été généré permettant de voir la distribution des différentes protéines au sein des conditions expérimentales (Figure 3.7B). Quatre différentes comparaisons sont possibles: 859 protéines se différencient entre le WT et le SOD1 dans l'EDL, le muscle vulnérable (Figure 3.7B : jaune) ainsi que 110 protéines sont différentes dans l'EOM, le muscle résistant, entre le WT et SOD1 (Figure 3.7B : rouge). Également, il est possible d'identifier 1937 protéines qui sont intrinsèquement différentes entre l'EDL et l'EOM chez le WT (Figure 3.7B : vert) et 860 protéines au stade symptomatique (Figure 3.7B : bleu). Un volcano-plot de l'ensemble des protéines de chacun des groupes de comparaison est également illustré (Figure 3.7C). Chaque protéine est représentée en fonction de l'expression (Log_2) déterminée via spectrométrie de masse et du « *p-value* » (Log_{10}) déterminée grâce à l'anova mixte. Les protéines situées en haut de la ligne colorée sur les graphiques diffèrent significativement dans la condition examinée (Figure 3.7C)

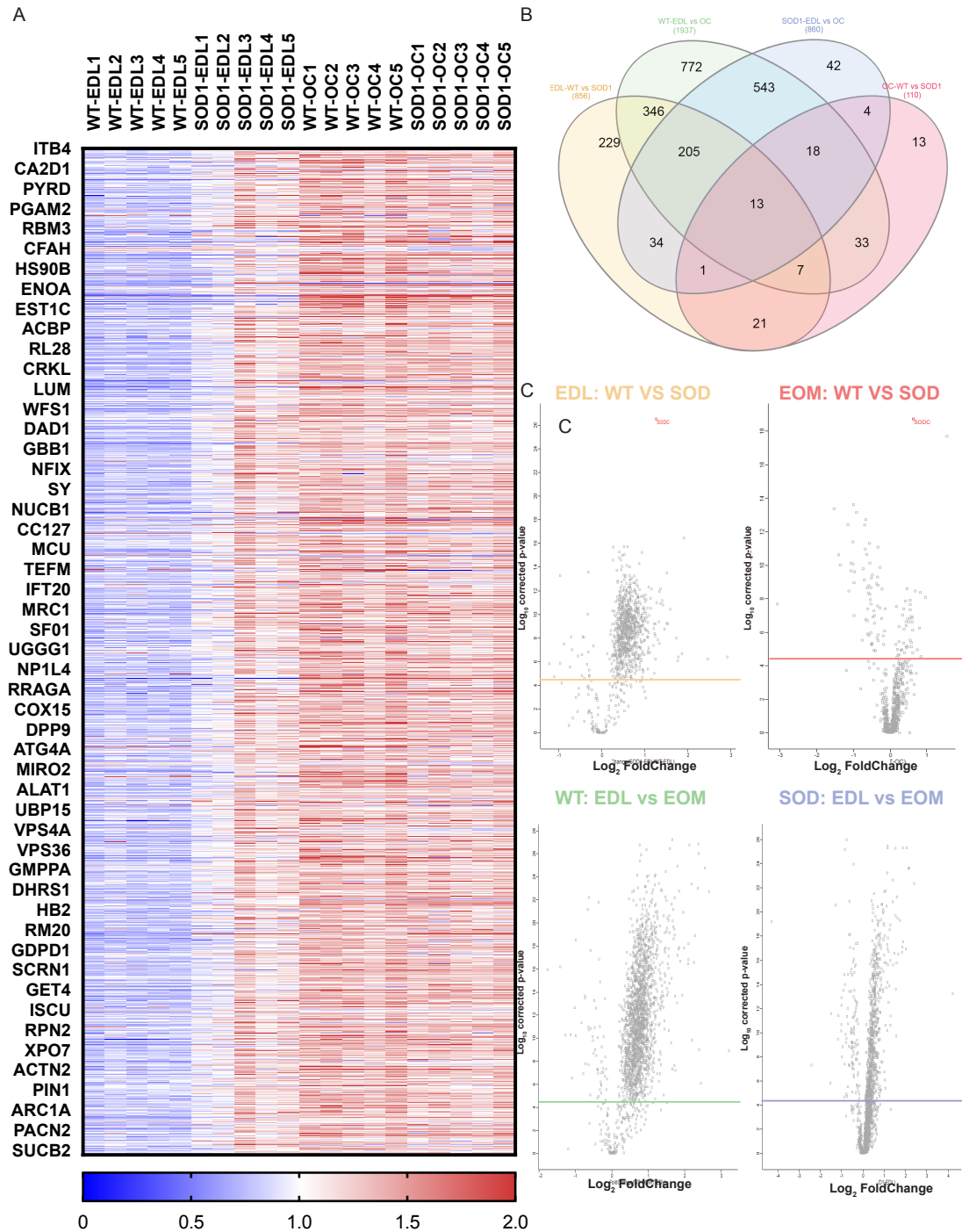


Figure 3.7 Les différences du protéome entre l'EOM et l'EDL dans la SLA

(A) Heat-map de l'ensemble des protéines qui sont différentes significativement dans l'ensemble des échantillons. (B) Diagramme de Venn répartissant les protéines selon les conditions (WT, SOD1, EDL, EOM). (C) Volcano plot de l'expression de toutes les protéines en fonction de leur « p-value » dans chacune des comparaisons possibles. Les protéines situées en haut de la ligne colorée diffèrent significativement dans la condition examinée ($p < 0.05$, Anova Mixte).

Une analyse exhaustive de toutes les différentes conditions seront présentées dans les sections subséquentes de ce mémoire. Pour chaque groupe d'analyse, les mêmes outils bio-informatiques seront utilisés afin de répondre à chaque question. Dans un premier temps, comme illustré dans la figure suivante (Figure 3.8) un « heat-map » des protéines de la condition sera généré (Figure 3.8A). Dans chaque « heat-map », l'expression de la protéine selon la condition (**cercle vert**) et le ratio d'expression entre deux conditions (**cercle orange**) seront représentés. Dans un second temps, une analyse des fonctions sera effectuée et un tableau contenant les informations essentielles des enrichissements de fonctions sera générée (numéro GOTERM, **cercle rouge**; FDR-q value, **cercle bleu**) (Figure 3.8C). Prendre note que lorsque les enrichissements seront mentionnés, leur numéro GO TERM sera entre parenthèse pour les identifier avec précision. Des « heat-map » de quelques-unes de ces fonctions seront également créées afin de faciliter l'analyse de ces fonctions (Figure 3.8B). Dans deux conditions, aucun enrichissement de fonction trouvé n'est statistiquement significatif (FDR q-value > 0.05). Dans ces cas, une recherche exhaustive des protéines afin de déterminer leur fonction individuelle ont été réalisés.

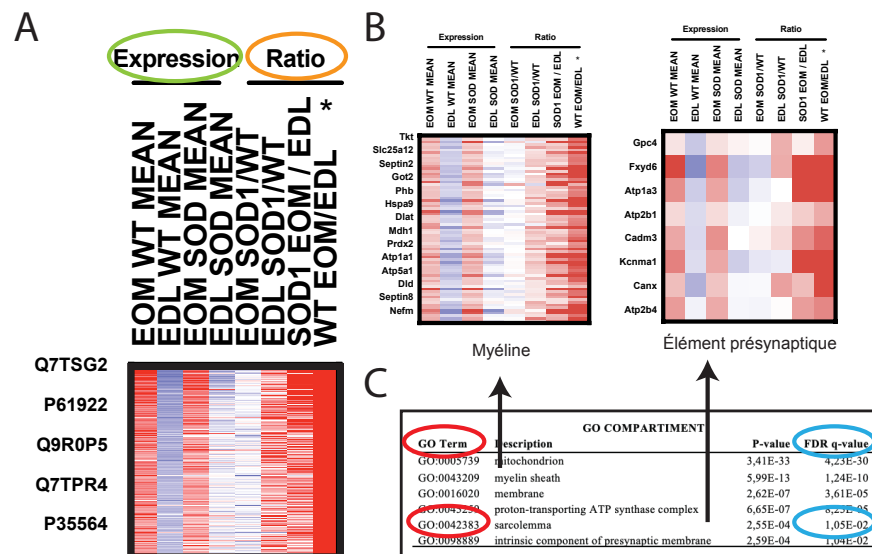


Figure 3.8 Exemple de figure et de tableau utilisés pour l'analyse protéomique. (A) Heat-map des protéines d'un groupe avec l'expression selon la condition (vert) et le ratio d'expression entre deux conditions (orange). (B) Heat-map des protéines contenues dans un enrichissement. (C) Tableau incluant les enrichissements avec l'identifiant GO Term (cercle rouge) ainsi que les FDR q-value (cercle bleu). Les Heat-Map (B) sont créées à partir des protéines des enrichissement de fonctions du tableau (C). Les tableaux seront insérés après la figure.

3.3.2 Les différences intrinsèques entre EOM et EDL retrouvées chez la préparation neuromusculaire saine

Tout d'abord, avant d'évaluer les différences des expressions protéiques qui pourraient expliquer cette résistance des muscles extraoculaires dans la maladie de la SLA, il est primordial de comprendre et d'évaluer les différences intrinsèques entre ces deux muscles. Quelles sont les différences intrinsèques retrouvées dans les préparations neuromusculaires saines? Dans la figure suivante (Figure 3.9), l'expression de 1937 protéines se distingue entre les muscles EDL et EOM chez les WT et plusieurs cascades moléculaires et fonctions cellulaires semblent se distinguer entre les deux muscles (Figure 3.8A, C, D). Cependant, quels sont les mécanismes qui sont spécifiquement augmentés dans les muscles EOM qui lui assurent d'accomplir ses fonctions.

Pour ce faire, un enrichissement de toutes les protéines dont l'expression est augmentée chez le muscle EOM versus EDL a été effectué. Dues au grand nombre de protéines et afin de déterminer plus spécifiquement les cascades se distinguant, une attention particulière a été portée sur celles qui présentent un niveau statistiquement plus significatif ($p\text{-value} < 0.0001$) (635 protéines, Gorilla Enrichissement). Tout comme illustré dans la Figure 3.9C, l'expression de ces protéines ainsi que le ratio d'expression EOM/EDL WT (*colonne en orange*) sont plus élevés (*en rouge*). Les EOMs se distinguent par une augmentation des processus responsables de la synthèse d'ATP (GO :0015986), des mécanismes d'oxydoréductions (GO:0055114, GO :0006733, GO:0016491) ainsi que des mécanismes responsables du métabolisme et de la régulation des neurotransmetteurs (GO :0042133, GO :0001505). Ces protéines se trouvent non seulement au niveau mitochondrial (GO:0005739) mais également au niveau présynaptique (GO :0098889) (Figure 3.9C, Tableau 3.3, Tableau 5.1 en annexe). Ainsi, ces mécanismes permettent aux muscles extraoculaires de favoriser leur fonction : une activation tonique et à haute fréquence qui nécessite une libération de neurotransmetteur et la synthèse ATP plus importantes.

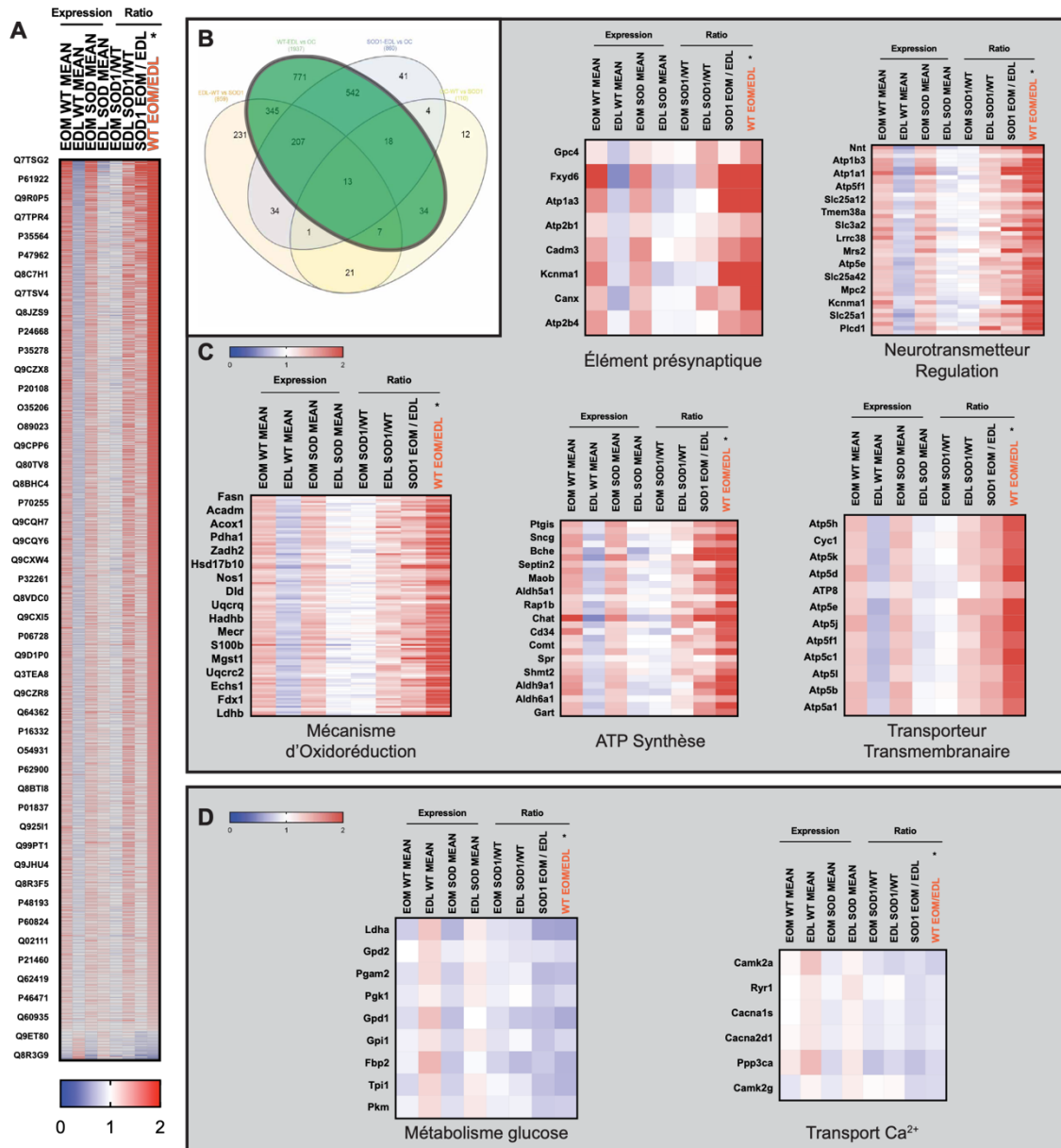


Figure 3.9 Profil d'expression protéique différentielle entre l'EOM et l'EDL chez le WT

(A) Heat-map illustrant l'ensemble des protéines dont le niveau d'expression se distingue significativement entre l'EOM et l'EDL chez le WT (1937 protéines, p -value < 0.05 : Anova mixte) (B) Diagramme de Venn avec la distribution des différentes protéines dans les conditions expérimentales. (C) Heat-map des protéines de différents enrichissements fonctionnels et de compartiments cellulaires augmentées chez l'EOM (Tableau 3.3; GOrilla, FDR q -value < 0.05). Dans ces groupes, le ratio WT EOM/EDL (orange) est élevé. (D) Heat-map des protéines de différents enrichissements fonctionnels et de compartiments cellulaires augmentées chez l'EDL. (Tableau 3.4; GOrilla, FDR q -value < 0.05) Dans ces groupes, le ratio WT EOM/EDL (orange) est bas.

Tableau 3.3 Enrichissement des processus, fonctions et composantes intracellulaires des 635 protéines qui sont augmentés dans le EOM WT versus EDL WT

GO PROCESSES

GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0034440	lipid oxidation	1,49E-08	1,46E-05
GO:0019395	fatty acid oxidation	1,49E-08	1,31E-05
GO:0034220	ion transmembrane transport	1,55E-07	9,09E-05
GO:0055114	oxidation-reduction process	1,71E-07	9,43E-05
GO:0042133	neurotransmitter metabolic process	1,64E-05	4,26E-03
GO:0006733	oxidoreduction coenzyme metabolic process	5,12E-05	1,19E-02
GO:0006937	regulation of muscle contraction	7,21E-05	1,63E-02
GO:0001505	regulation of neurotransmitter levels	8,72E-05	1,83E-02
GO:1903115	regulation of actin filament-based movement	1,25E-04	2,56E-02
GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport	1,29E-04	2,52E-02
GO:0006942	regulation of striated muscle contraction	2,56E-04	4,43E-02

GO FONCTIONS

GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0016491	oxidoreductase activity	2,13E-09	1,62E-06
GO:0015075	ion transmembrane transporter activity	6,05E-08	3,45E-05
GO:0042626	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances	2,02E-05	3,53E-03
GO:0005509	calcium ion binding	5,36E-04	3,70E-02
GO:0009055	electron transfer activity	8,48E-04	4,95E-02

GO COMPARTIMENT

GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0005739	mitochondrion	3,41E-33	4,23E-30
GO:0043209	myelin sheath	5,99E-13	1,24E-10
GO:0016020	membrane	2,62E-07	3,61E-05
GO:0045259	proton-transporting ATP synthase complex	6,65E-07	8,25E-05
GO:0042383	sarcolemma	2,55E-04	1,05E-02
GO:0098889	intrinsic component of presynaptic membrane	2,59E-04	1,04E-02

Protéines utilisées : p-value < 0.0001; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla. Le tableau complet se trouve en annexe (voir tableau Tab P1). Les GO Term en gras sont les fonctions utilisées dans la figure 3.9C.

Dans le même ordre d'idée, quels sont les mécanismes qui sont augmentés spécifiquement au niveau des muscles EDL pertinents pour leur fonction spécifique? Pour ce faire, l'analyse bio-informatique a été effectuée sur les protéines augmentées spécifiquement au niveau du EDL et donc le ratio WT EOMvEDL (**orange**) est bas. Plus de 125 processus, 28 fonctions et 9 compartiments cellulaires ont été trouvés avec les 59 protéines respectant le critère mentionné précédemment (59 protéines, p-value < 0.01, GOrilla : FDR< 0.05; Tableau 3.4, Tableau 5.2 en annexe). Plusieurs cascades moléculaires convergent vers les processus permettant la gestion du glucose, le métabolisme du glucose (GO :0006006, GO :0006096) et la gluconéogenèse (GO :0006094) ainsi que des mécanismes importants au niveau de la gestion calcique (GO :0006816, GO :0015085) dans les fibres musculaires (GO :0003012, GO :0030018) (Figure 3.8D, Tableau 3.4).

Ces résultats sont prévisibles pour différentes raisons. Entre autres, l'EDL est un muscle plus volumineux que les EOMs : il est donc cohérent que les protéines en lien avec des composantes intrinsèques musculaires donc le « z-disc » et le réticulum sarcoplasmique (Tableau 3.4), la réserve calcique primordiale à la contraction musculaire, soit plus élevée dans l'EDL. En effet, un muscle composé d'un nombre supérieur de fibres musculaires doit posséder un plus grand réseau de réticulum sarcoplasmique. Également, pour générer un mouvement rapide par les muscles du EDL, ces fibres musculaires utilisent le glucose afin de générer l'ATP nécessaire pour la contraction musculaire appropriée. Ceci est donc cohérent avec l'augmentation des fonctions en lien avec la gestion du glucose obtenu (Figure 3.8D, Tableau 3.4).

Ainsi, ces résultats reflètent bel et bien les différences intrinsèques entre l'EDL et l'EOM puisque l'EDL est composé en majorité des fibres FF qui utilisent le glucose comme source rapide d'énergie contrairement aux EOM qui sont composés en majorité d'une unité motrice FR_{EOM} (anglais : fast-resistant EOM specific) qui utilise les processus d'oxydations comme source d'énergie pour la contraction musculaire. Cependant, parmi ces différences intrinsèques, est-ce qu'il y en a qui sont altérées dans la SLA et qui pourrait expliquer la résistance des EOMs au stade symptomatique?

Tableau 3.4 Enrichissement des processus, fonctions et composantes intracellulaires des 59 protéines qui sont augmentés dans le EDL WT versus EOM WT

GO PROCESSES

GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0006094	gluconeogenesis	3,26E-11	4,79E-08
GO:0006006	glucose metabolic process	5,77E-10	3,91E-07
GO:0006096	glycolytic process	3,29E-09	1,53E-06
GO:0048741	skeletal muscle fiber development	4,02E-05	4,17E-03
GO:0006816	calcium ion transport	2,37E-04	1,94E-02
GO:0003012	muscle system process	6,36E-04	4,52E-02

GO FONCTIONS

GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0004683	calmodulin-dependent protein kinase activity	4,31E-07	9,81E-04
GO:0005262	calcium channel activity	5,64E-06	3,21E-03
GO:0015085	calcium ion transmembrane transporter activity	2,88E-05	7,29E-03
GO:0050308	sugar-phosphatase activity	6,14E-04	4,82E-02

GO COMPARTIMENTS

GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0030018	Z disc	1,92E-06	2,39E-03
GO:0016529	sarcoplasmic reticulum	2,50E-06	1,55E-03
GO:0005891	voltage-gated calcium channel complex	1,43E-04	2,21E-02

Protéines utilisées : p-value < 0.01; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla. Le tableau complet se trouve en annexe (voir tableau en Annexe 5.2). Les GO Term en gras sont les fonctions utilisées dans la figure 3.9D

3.3.3 Les différences intrinsèques entre EOM et EDL maintenues durant le stade symptomatique

Dans un deuxième temps, des différences intrinsèques ont été observées entre l'EOM et l'EDL. Est-ce que ces différences sont maintenues dans la SLA? Pour ce faire, l'enrichissement des processus, des fonctions ainsi que des compartiments cellulaires a été effectué sur un groupe spécifique contenant 542 protéines qui sont à la fois différentes entre le EOM et EDL chez le WT ainsi que chez le SOD1 (Figure 3.9D). Comme illustré dans le diagramme de Venn (Figure 3.9D), ces 542 protéines se distinguent entre l'EOM et l'EDL chez les WT ainsi que chez les SOD1 symptomatique. La majorité de ces protéines sont exprimées davantage dans les EOM comparativement aux EDL dans les deux conditions (Figure 3.9A) et possédant un ratio WT EOMvEDL (**orange**) et un ratio SOD1 EOMvEDL (**bleu**) élevé (Figure 3.9A).

Afin de valider les fonctions augmentées dans l'EOM chez les WT ainsi que lors du stade symptomatique SOD1, un enrichissement des protéines exprimées davantage chez l'EOM comparativement à l'EDL dans ces deux conditions a été effectué (504 protéines, $p\text{-value} < 0.01$, GOrilla Enrichissement). Il a été possible d'identifier 20 fonctions ainsi que 15 compartiments cellulaires distinctifs (Tableau 3.5, $\text{FDR } q\text{-value} < 0.05$). Certaines fonctions liées aux transporteurs transmembranaires (GO :0022857, GO :0015075) à l'activité d'oxydoréduction (GO :001641), à la liaison calcique (GO :0005509), ainsi que de constituant structurel de la matrice extracellulaire (GO :0005201) sont maintenues (Figure 3.10B, Tableau 3.5, Tableau 5.3 en annexe). Ces protéines sont retrouvées principalement au niveau mitochondrial (GO:0044429), mais certaines sont également retrouvées au niveau de la gaine de myéline (GO :0043209) ainsi qu'au niveau de la membrane présynaptique (GO :0098800 [non significatif : $\text{FDR-}q \text{ value} = 0.0536$]) (Figure 3.10B, Tableau 3.5, Tableau 5.3 en Annexe).

Ainsi, dans le muscle résistant, certaines protéines et enzymes sont davantage exprimées dans l'EOM que dans l'EDL chez les animaux sains (WT) et ses différences sont maintenues lors du stade symptomatique de la SLA. En effet, l'augmentation des protéines en lien avec la gaine de myéline et le compartiment présynaptique suggérerait le maintien des éléments présynaptiques. Ceci a été également observé dans l'analyse de la morphologie des JNMs des EOMs présentée antérieurement (Figure 3.1; section 3.1). Également l'augmentation des fonctions d'oxydoréductions, des protéines liant le calcium ainsi qu'en lien avec la fonction mitochondriale le maintien de la fonction motrice sont reportées. Ceci peut exercer un effet protecteur puisque le

stress oxydatif ainsi qu'une mauvaise gestion du calcium peut mener au processus de neurodégénération (Singh, Kukreti et al. 2019).

Une analyse similaire a été effectuée avec les protéines exprimées davantage chez les muscles EDL versus EOM dans les muscles sains ainsi qu'au stade symptomatique de la SLA (32 protéines, p-value <0.01, GOrilla Enrichissement). Il a été possible d'identifier plus de 90 processus cellulaires (Tableau 3.6, FDR q-value < 0.05). Principalement, les processus glycolytiques (GO :0006006, GO :0006096, GO :0006094) menant à la synthèse d'ATP (GO :0006091) sont plus élevés spécifiquement dans l'EDL chez le WT ainsi que durant le stade symptomatique de la SLA (Tableau 3.5, Tableau P4, Figure 3.9C). Ainsi, il semblerait que les mécanismes permettant aux muscles vulnérables de maintenir leur fonction motrice via les processus de glycolyse soient maintenus aux stades symptomatiques de la SLA. Également, une augmentation de la glycolyse dans les motoneurones a été reportée comme un mécanisme compensatoire pouvant avoir des effets neuroprotecteur (Manzo, Lorenzini et al. 2019) pouvant suggérer une certaine adaptation des muscles vulnérables à ce stade de la maladie.

En somme, certaines fonctions ainsi que processus cellulaires se distinguant normalement entre l'EOM et l'EDL chez le WT semblent être maintenues chez les SOD1 au stade symptomatique. Dans les EOMs, des mécanismes mitochondriaux et des protéines retrouvées dans la myéline semblent être maintenues. Également, les mécanismes reliés à la glycolyse et aux différentes cascades permettant la génération du glucose, principale source d'énergie chez l'EDL, semblent être maintenu durant le stade symptomatique de la SLA. Cependant, existe-t-il des protéines et/ou des cascades moléculaires qui se distinguent uniquement entre le muscle vulnérable et le muscle résistant au stade symptomatique qui pourrait expliquer leurs résistances distinctes à la progression de la SLA?

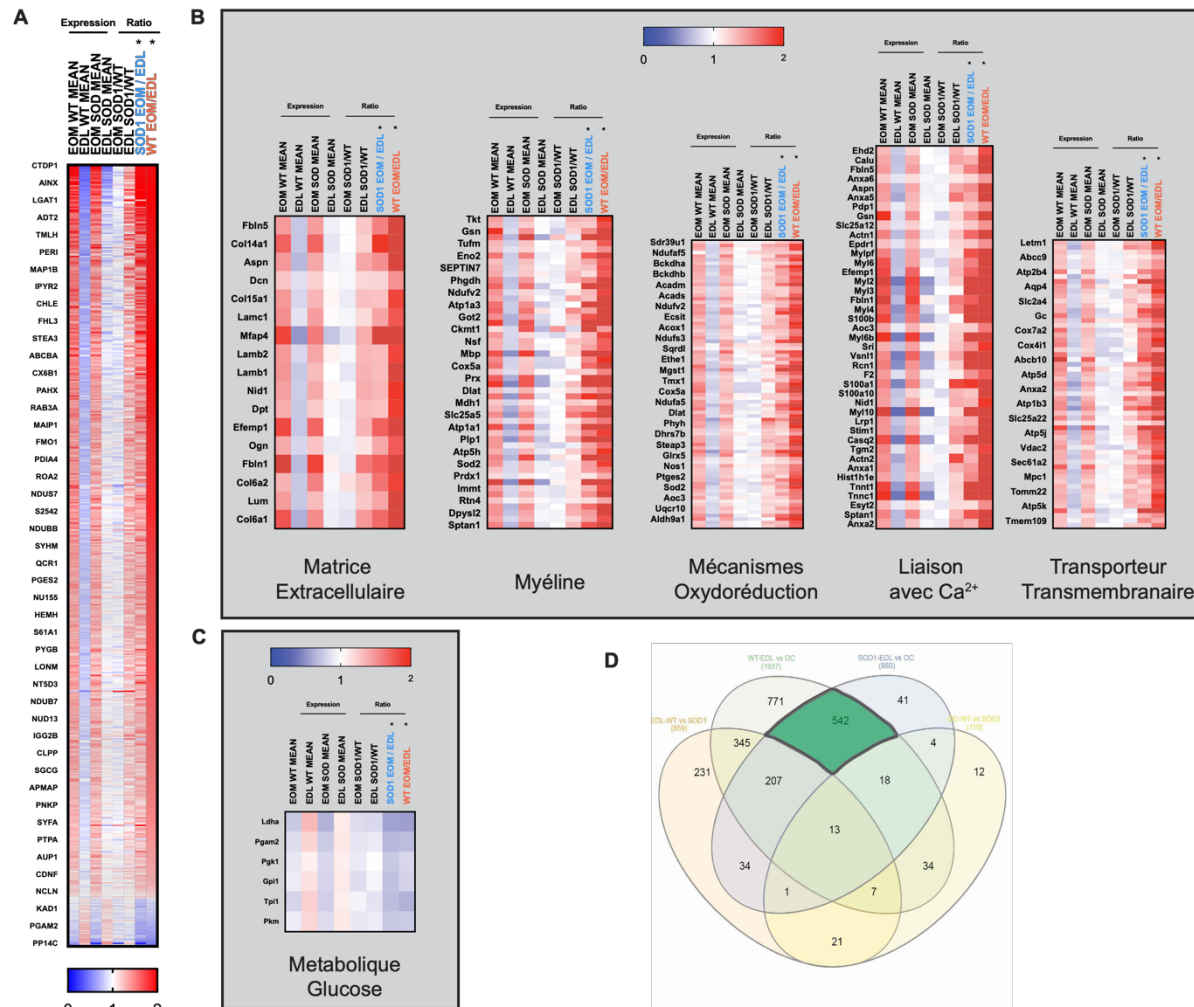


Figure 3.10 Profil d'expression des protéines différentielles entre l'EOM et l'EDL chez le WT et chez le SOD1

(A) Heat-map illustrant l'ensemble des protéines dont le niveau d'expression se distingue significativement entre l'EOM et l'EDL chez le WT (542 protéines, p-value < 0.05 : Anova mixte) (B) Heat-map des protéines de différents enrichissements fonctionnels et de compartiments cellulaires augmentées chez l'EOM (Tableau 3.5; GOrilla, FDR q-value < 0.05). Dans ces groupes, le ratio WT EOM/EDL (orange) et le ration SOD1 WT EOM/EDL (bleu) sont élevés. (C) Heat-map des protéines de différents enrichissements fonctionnels et de compartiments cellulaires augmentées chez l'EDL. (Tableau 3.6; GOrilla, FDR q-value < 0.05). Dans ces groupes, le ratio WT EOM/EDL (orange) et le ration SOD1 WT EOM/EDL (bleu) sont bas. (D) Diagramme de Venn avec la distribution des différentes protéines dans les conditions expérimentales.

Tableau 3.5 Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 504 protéines qui sont augmentées dans le EDL WT versus EOM WT et SOD1

GO FONCTIONS

GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0022857	transmembrane transporter activity	1,07E-11	2,44E-08	
GO:0016491	oxidoreductase activity	2,84E-05	8,08E-03	
GO:0005509	calcium ion binding	9,57E-05	2,18E-02	
GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	2,10E-04	3,41E-02	
GO:0042626	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances	2,10E-04	3,19E-02	

GO COMPONENT

GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0005739	mitochondrion	1,20E-11	3,71E-09	
GO:0043209	myelin sheath	2,27E-07	3,52E-05	
GO:0016021	integral component of membrane	3,33E-06	4,13E-04	
GO:0044420	extracellular matrix component	1,74E-04	1,54E-02	
GO:0099056	integral component of presynaptic membrane	6,92E-04	5,36E-02	

Protéines utilisées : p-value < 0.01; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla. Le tableau complet se trouve en annexe (voir tableau 5.3 en annexe). Les fonctions en gras ont été utilisées dans la figure 3.10B.

Tableau 3.6 Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 32 protéines qui sont augmentées dans le EDL WT versus EOM WT et SOD1

GO PROCESSES

GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0016052	carbohydrate catabolic process	1,31E-09	5,77E-06
GO:0006006	glucose metabolic process	5,97E-08	4,39E-05
GO:0006096	glycolytic process	6,97E-08	4,39E-05
GO:0046034	ATP metabolic process	7,00E-07	2,68E-04
GO:0006094	gluconeogenesis	2,02E-06	6,15E-04
GO:0006754	ATP biosynthetic process	7,26E-06	1,31E-03
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	8,99E-06	1,59E-03
GO:0006733	oxidoreduction coenzyme metabolic process	1,70E-05	2,63E-03

Protéines utilisées : p-value < 0.01; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla. Le tableau complet se trouve en annexe (voir tableau 5.4 en annexe). Les fonctions en gras ont été utilisées dans la figure 3.10C.

3.3.4 Les différences des protéomes du EOM et du EDL dans la SLA

Il est important de s'interroger sur les différences entre les muscles résistants et les muscles vulnérables lors du stade symptomatique de la SLA. Ceci permet de décortiquer les processus qui pourraient leur octroyer leur vulnérabilité distincte à la progression de la SLA. Existe-t-il des cascades moléculaires spécifiques aux EOMs lui permettant de s'adapter ou de maintenir sa fonction? Pour ce faire, l'analyse des différentes protéines dont l'expression se distingue entre les deux muscles lors du stade symptomatique de la SLA a été effectuée. Comme illustré dans le diagramme de Venn (Figure 3.11), dans les 860 protéines qui se distinguent entre l'EOM et l'EDL (Figure 3.11B), 780 protéines sont des protéines qui se distinguent à la fois chez les SOD et les WT. Une partie de ce sous-groupe a été analysé précédemment (section 3.3) et a permis de révéler quelques mécanismes cellulaires (processus d'oxydoréduction, tamponnage calcique) qui pourraient octroyer une certaine résistance aux EOMs aux mécanismes toxiques observés dans la SLA.

Tout d'abord, dans les protéines se distinguant entre l'EOM et l'EDL au stade symptomatique de la SLA, 80 protéines sont différentes exclusivement chez les souris SOD1 symptomatique (Figure 3.11A, protéines en bleu). Dans ce total, 14 protéines sont augmentées spécifiquement dans l'EOM (Figure 3.11C : Ratio SOD1 EOMvEDL élevé) tandis que 66 sont augmentés dans l'EDL (Figure 3.11D : Ratio SOD1 EOMvEDL bas). Dû au nombre limité de protéines, aucun enrichissement significatif n'est ressorti. Malgré tout, suite à une recherche exhaustive, plusieurs fonctions et rôles ont été identifiés (Figure 3.11B). Entre autres, des protéines telles que la Plexin-B2, importante pour la plasticité synaptique et la croissance axonale (Figure 3.11C, **cercle bleu**) (Masuda, Furuyama et al. 2004) est exprimé davantage dans le muscle résistant. Des protéines également importantes pour l'homéostasie protéique dont les « *heat shock* » protéines importantes pour le maintien des structures tridimensionnelles protéiques telles que *PFD6* (prefoldin subunit 6) (Son, Seo et al. 2018) et *DJC17* (Dnaj homolog subfamily C) (Pascarella, Ferrandino et al. 2018) sont augmentées dans les EOMs au stade symptomatique (Figure 3.11C, **cercle mauve**). De manière intéressante, *UBQL4* (ubiquilin-4), une protéine importante pour le protéosome et dont l'altération est impliquée dans la pathogenèse de la SLA (Figure 3.11C, **cercle rose**) (Edens, Yan et al. 2017) est augmenté spécifiquement dans les muscles résistants : suggérant ainsi que le maintien des fonctions du protéosome, le maintien de

l'homéostasie protéique ainsi que les mécanismes favorisant la croissance axonale pourraient conférer une résistance supplémentaire.

Par ailleurs, la majorité des protéines qui se distinguent entre l'EOM et l'EDL au stade symptomatique sont attribuables à une augmentation d'expression dans le muscle vulnérable. Quelles cascades moléculaires pourraient expliquer cette vulnérabilité? Dans un premier temps, des protéines importantes pour la plasticité synaptique et la croissance de neurites sont augmentées dans les muscles vulnérables (*RBM3*, *IF5A1*, *COBL*, *MYOC*, *KCC2B*) (Figure 3.11D, **cercle bleu**). Ceci pourrait concorder avec les phénomènes de réinnervation qui sont observés dans les muscles vulnérables (Tremblay, Martineau et al. 2017, Martineau, Di Polo et al. 2018). Par ailleurs, plusieurs protéines jouant un rôle dans la séquestration calcique (*JR1*, *FKB1A*, *CAN3*, *DIAP1*) (Figure 3.11D, **cercle vert**) sont augmentées suggérant la possibilité de mécanisme compensatoire qui pourrait tenter de diminuer le calcium cellulaire. Finalement, quelques protéines contribuant au déclenchement et/ou à la progression de la SLA sont augmentées dans le muscle vulnérable EDL (*14-3-3G*, *CAN3*, *PIN4*, *TCTP*, *MT2*) (Figure 3.11A, **cercle rose**). Ainsi, une analyse subséquente de la contribution de ces protéines est nécessaire puisque leur rôle semble être mieux défini au niveau du SNC comparativement au niveau de la JNM.

Somme toute, certains processus cellulaires dans les muscles résistants tels les processus d'oxydoréduction, le tamponnage du calcium (section 3.3.3), l'homéostasie protéique et la croissance axonale (section 3.3.4) seraient des mécanismes potentiels pour octroyer cette résistance particulière aux EOMs. Dans les muscles vulnérables, des mécanismes compensatoires en lien avec la gestion du glucose (section 3.3.3), avec les tentatives de régénération neuronale et de séquestration du calcium (section 3.3.4) sont observés. Or, les comparaisons précédentes ont été effectuées entre les muscles résistants et les muscles vulnérables chez l'animal sain puis dans l'animal symptomatique. Cependant, comment les muscles vulnérables ou les muscles résistants se distinguent du stade symptomatique à l'animal sain? En d'autres mots, quels sont les changements moléculaires affectant spécifiquement les muscles vulnérables (section 3.3.5) et les muscles résistants (section 3.3.6)?

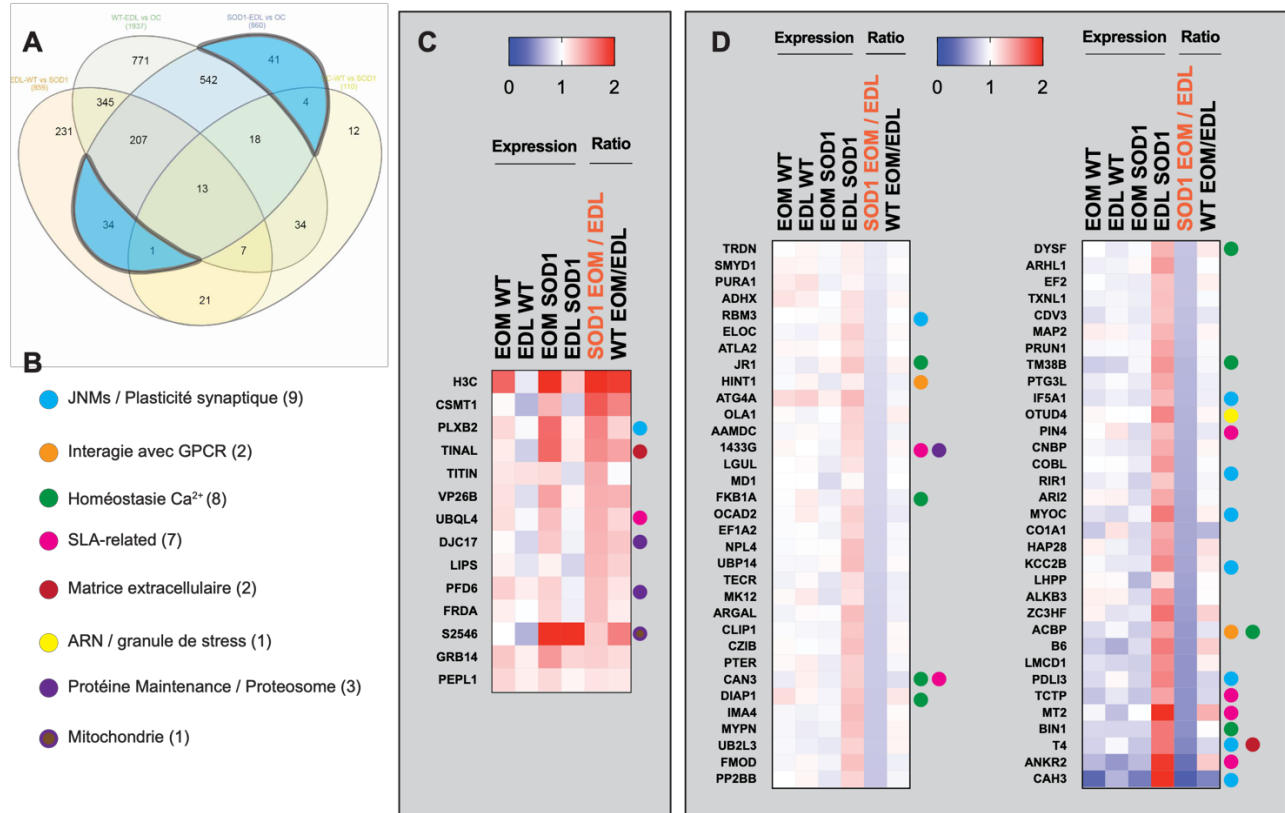


Figure 3.11 Expression différentielle protéique de l'EOM et l'EDL dans la SLA
 (A) Diagramme de Venn avec la distribution des différentes protéines dans les conditions. Les protéines analysées sont mises en évidence (bleu). (B) Fonctions générales des protéines déterminées suite à une recherche exhaustive avec le nombre de protéine possédant une fonction similaire (C-D) Heat-map des protéines illustrant l'ensemble des protéines dont le niveau d'expression se distingue significativement entre l'EOM et l'EDL uniquement chez le SOD1 (80 protéines, p -value < 0.05 : Anova mixte). (C) Heat-map des protéines (14 protéines) qui sont exprimées davantage dans l'EOM (ratio SOD1 EOM/EDL plus élevé). (D) Heat-map des protéines (66 protéines) qui sont exprimées davantage dans l'EDL (ratio SOD1 EOM/EDL plus bas). Sur plusieurs protéines, leurs fonctions est mis en évidence.

3.3.5 Les atteintes dans l'EDL au stade symptomatique de la SLA

Subséquentement, l'analyse des différences entre les muscles EOM et EDL chez les WT et les SOD1 a permis d'identifier certaines fonctions cellulaires maintenues et/ou altérées dans certaines conditions. Cependant, comment le muscle vulnérable est-il touché spécifiquement? Au total, dans l'EDL, toutes conditions confondues, l'expression de 859 protéines va être significativement différente entre le WT et le SOD1 (Figure 3.12A, **Section orange**). Un *heat-map* de l'ensemble de ces protéines a été généré et globalement, il est possible d'observer une augmentation d'expression de ces gènes (Figure 3.12A, Ratio EDL SOD1/WT élevé). Cependant, comme illustré dans le diagramme de Venn, plusieurs de ces protéines sont également différentes dans l'EOM WTvSOD1 (Figure 3.12A, **Section Jaune**). Ainsi, quelles sont les fonctions qui sont spécifiquement altérées dans le muscle vulnérable? Pour ce faire, l'analyse de quelques sous-groupes particuliers sera nécessaire.

Dans un premier temps, quelles sont les cascades moléculaires qui sont exclusivement et uniquement affectées dans le muscle EDL entre le SOD1 et WT? Un groupe de 231 protéines répondent à ce critère (Figure 3.12B, Diagramme de Venn : **Groupe surligné en orange**). L'analyse bio-informatique a permis d'identifier plusieurs fonctions cellulaires dont celles reliées aux cascades cataboliques de macromolécule (GO:0009057), reliées au protéosome (GO:0010498) ainsi qu'au pore nucléaire (GO:0005643) (Figure 3.12B, Tableau 3.7). Ceci concorde avec le phénotype observé. En effet, durant le stade symptomatique de la SLA, de nombreux processus de dégradation cellulaires sont augmentés exclusivement dans le muscle vulnérable ce qui peut concorder avec le processus de dénervation et d'atrophie musculaire en cours. Également, l'augmentation des protéines en lien avec le pore nucléaire va de pair avec une récente implication du transport nucléaire dans la SLA. Une perturbation du transport nucléaire est observée dans plusieurs modèles SLA (Chou, Zhang et al. 2018).

Finalement, existe-t-il l'activation de cascades moléculaires adaptatives dans les muscles vulnérables, mais qui seraient ultimement inefficaces? Pour répondre à cette question, un sous-groupe spécifique contient des protéines qui diffèrent entre l'EDL SODvWT (adaptation du muscle vulnérable), mais qui demeurent malgré tout inférieures entre le muscle vulnérable et le muscle résistant (207 protéines, Figure 3.12C). L'analyse d'enrichissement de fonction de ce groupe spécifique a permis d'identifier deux processus cellulaires : les processus d'oxydoréduction (GO:0016491) ainsi que les processus activés lors de la présence de protéines mal repliées

(GO:0051082) (Figure 3.12C, Tableau 3.8). Ces deux fonctions sont augmentées dans le muscle vulnérable durant le stade symptomatique de la SLA (ratio EDL SODvWT élevé, **colonne orange**), cependant, malgré tout, ces deux fonctions demeurent plus élevées dans l'EOM comparativement à l'EDL tant chez les WT (ratio WT EOMvEDL élevé, **colonne bleue**) que chez les SOD1 (ratio SOD1 EOMvEDL élevé, **colonne verte**). Ceci pourrait suggérer entre autres que lors du stade symptomatique de la SLA, les muscles vulnérables vont s'adapter face au stress oxydatif ou aux protéines mal repliées en augmentant l'expression de plusieurs protéines importantes pour réduire ces phénomènes. Par ailleurs, les muscles résistants vont exprimer intrinsèquement davantage ces processus cellulaires ce qui pourrait leur conférer une résistance particulière. De nombreuses études dans le domaine ont démontré l'importance des *heat-shock* protéine dans la clairance et la prévention des protéines mal repliées dans un potentiel but thérapeutique (Kalmar, Novoselov et al. 2008, Chen, Mitchell et al. 2016). Présentement, l'edaravone, un antioxydant, est le second traitement approuvé pour la SLA qui ralentit la neurodégénération des MNs chez quelques patients en diminuant le stress oxydatif (Bhandari, Kuhad et al. 2018). Ainsi, les muscles vulnérables semblent favoriser des mécanismes qui pourraient ultimement les protéger, cependant, ces derniers sont significativement plus réduits comparativement aux muscles résistants.

En somme, plusieurs différences lors du stade symptomatique de la maladie semblent être dues à des cascades moléculaires touchées spécifiquement par le muscle vulnérable tel le protéosome, les cascades de catabolisme de macromolécules, et de transport nucléaire, jusqu'à certains mécanismes importants pour la gestion des protéines possédant un repliement inadéquat.

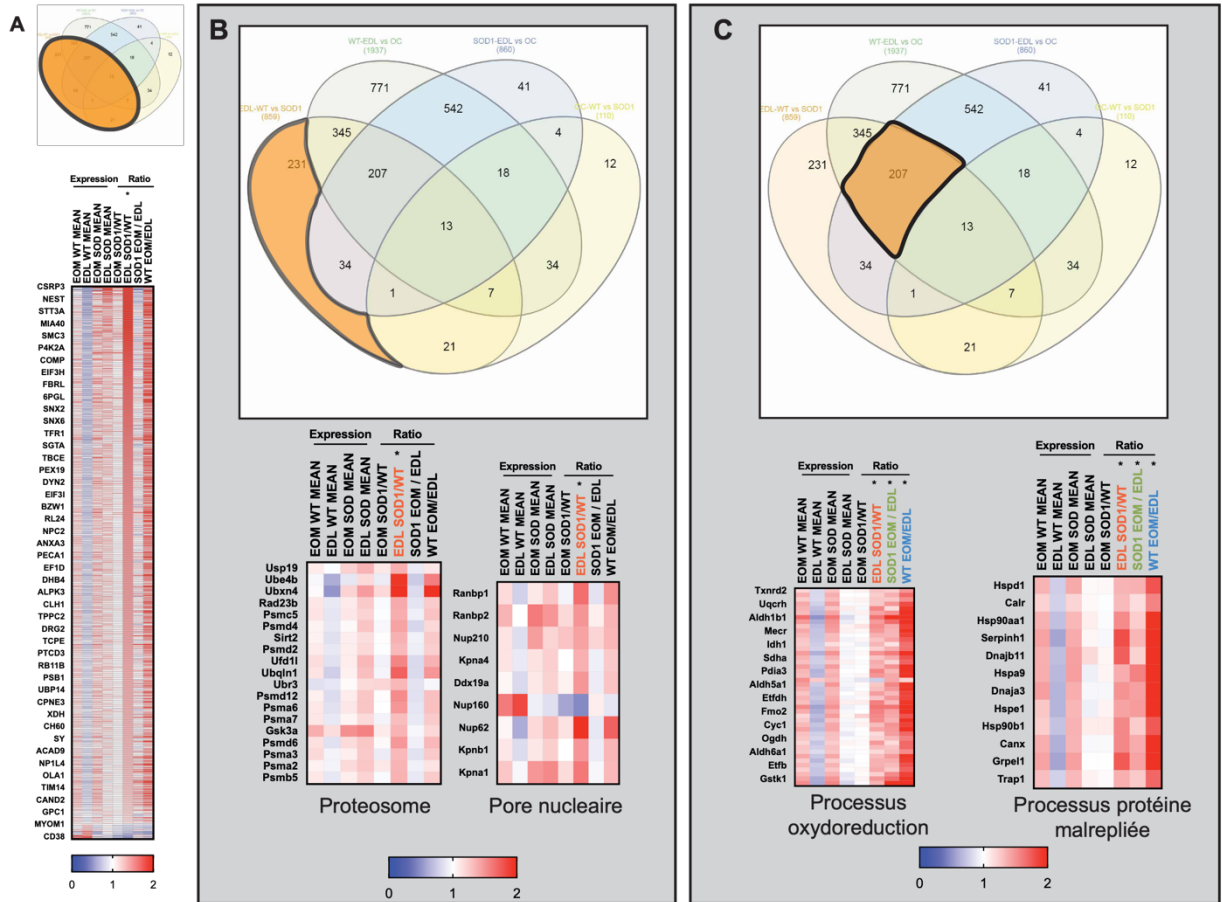


Figure 3.12 Profil d'expression de l'EDL dans la SLA
 (A) Diagramme de Venn et Heat-map illustrant l'ensemble des protéines dont le niveau d'expression se distingue significativement (859 protéines, p -value < 0.05 : Anova mixte). (B) Diagramme de Venn et heat-map illustrant les différents enrichissements fonctionnels et de compartiments cellulaires des 231 protéines dont le niveau d'expression se distingue significativement et exclusivement chez le EDL entre le WT et SOD1 (Tableau 3.7, GOrilla, FDR q -value < 0.05). (D) Diagramme de Venn et heat-map illustrant les différents enrichissements fonctionnels et de compartiments cellulaires des 207 protéines qui diffèrent chez WT et SOD1 entre l'EDL et l'EOM ainsi qu'entre l'EDL WT et le SOD1 (Tableau 3.8, GOrilla, FDR q -value < 0.05)

Tableau 3.7 Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 231 protéines qui sont exclusivement différentes entre le WT et SOD1 chez l'EDL

GO PROCESS

GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0009057	macromolecule catabolic process	4,64E-06	2,16E-02	
GO:0010498	proteasomal protein catabolic process	6,22E-06	1,93E-02	
	proteolysis involved in cellular protein catabolic process			
GO:0051603		2,80E-05	4,36E-02	

GO COMPONENT

GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:000502	proteasome complex	1,81E-07	1,19E-04	
GO:1905368	peptidase complex	4,83E-07	1,59E-04	
GO:0005838	proteasome regulatory particle	5,39E-05	1,18E-02	
GO:0005643	nuclear pore	5,40E-05	1,01E-02	
GO:0005634	nucleus	2,47E-04	3,60E-02	

Protéines utilisées : p-value < 0.05; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla). Le tableau complet se trouve en annexe (voir tableau 5.5 en Annexe). Les enrichissements en gras sont ceux utilisés dans la figure 3.12B

Tableau 3.8 Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 207 protéines qui sont différentes entre le WT et SOD1 chez l'EDL ainsi que différentes entre l'EDL et l'EOM chez le WT et chez le SOD1

GO PROCESS

GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0017144	drug metabolic process	9,23E-12	8,60E-08	
GO:0044281	small molecule metabolic process	2,16E-11	1,01E-07	
GO:0055114	oxidation-reduction process	1,30E-07	1,10E-04	
GO:0006635	fatty acid beta-oxidation	1,78E-05	7,56E-03	
GO:0009117	nucleotide metabolic process	4,81E-05	1,73E-02	
GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process	6,53E-05	2,25E-02	
GO:0009062	fatty acid catabolic process	9,01E-05	3,00E-02	

GO FUNCTION

GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0016491	oxidoreductase activity	1,05E-07	2,59E-04	
GO:0009055	electron transfer activity	1,79E-05	1,11E-02	
GO:0051540	metal cluster binding	2,55E-05	1,26E-02	
GO:0051082	unfolded protein binding	1,76E-04	4,84E-02	

GO COMPONENT

GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0005739	mitochondrion	5,00E-27	6,56E-24	
GO:0031974	membrane-enclosed lumen	1,07E-08	1,28E-06	
GO:0098798	mitochondrial protein complex	3,10E-07	3,39E-05	
GO:0043229	intracellular organelle	1,38E-06	1,39E-04	
GO:0005777	peroxisome	5,04E-04	2,36E-02	

Protéines utilisées : p-value < 0.05; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla). Le tableau complet se trouve en annexe (voir tableau 5.6 en Annexe). Les enrichissements en gras sont ceux utilisés dans la figure 3.12C

3.3.6 L'EOM : les cascades moléculaires altérées dans la SLA

Dans les sections précédentes, les cascades moléculaires distinctes entre l'EOM et l'EDL ont été investiguées dans le modèle sain comparativement lors du stade symptomatique de la maladie ainsi que les cascades touchant spécifiquement le muscle vulnérable. Cependant, quels sont les mécanismes spécifiques au muscle résistant qui sont touchés lors de la phase symptomatique de la SLA ? Existe-t-il une certaine adaptabilité de ce muscle qui pourrait contribuer à cette résistance particulière lors de l'apparition des symptômes ?

Pour ce faire, nous avons comparé l'enrichissement de l'ensemble des protéines qui diffère entre le EOM WTVSOD toutes les conditions confondues (110 protéines p-value < 0.05, GOrilla, Figure 3.13, Tableau 3.9). Quelques processus cellulaires tels que la régulation négative de la transmission synaptique (GO :0050805) (Figure 3.13D, Tableau 3.9) l'organisation des neurofilaments du cytosquelette (GO :0060052), la dépression synaptique à long terme (GO :0060292) et les protéines en lien avec la régulation du développement du système nerveux (GO :0051960) (Figure 3.13D, Tableau 3.9) ont été identifiées (110 protéines, p-value < 0.05, GOrilla, Figure 17C, Tableau 3.9). Malheureusement ces enrichissements ne sont pas significatifs (FDR q-value = 1) et une analyse des protéines individuelles plus approfondie est requise.

Tableau 3.9 Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 110 protéines qui sont différentes entre le WT et SOD1 chez l'EOM
GO PROCESSES

GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0050805	Negative regulation of synaptic transmission	2,10E-04	1,00	
GO:0060052	Neurofilament cytoskeleton organization	5,98E-04	1,00	
GO:0060292	Long-term synaptic depression	5,98E-04	1,00	
GO:0051960	Regulation of nervous system development	9,47E-04	1,00	

Protéines utilisées : p-value < 0.05. Les enrichissements en gras sont ceux utilisés dans la figure 3.13D

Afin d'effectuer une analyse plus exhaustive des protéines qui sont alternées au stade symptomatique de la SLA dans les muscles résistants, les protéines qui sont exclusivement modifiées dans l'EOM et non l'EDL ont été investiguées. 68 protéines sont uniquement alternées dans l'EOM dont respectivement 10 et 58 protéines sont augmentées ou diminuées entre l'EOM SOD1 et WT (Figure 3.13A-B). Dans les protéines augmentées au stade symptomatique, certaines

sont importantes pour le maintien axonal (**cercle jaune** : *NFM*, *NFL*), ont un rôle dans la plasticité synaptique (**cercle bleu** : *4EBP2*), ainsi que pour la fonction mitochondriale (**cercle brun** : *TOM6*, *MRS2*) (Figure 3.13A).

Cependant, pour la majorité des protéines qui diffèrent entre le WT et le SOD1 symptomatique dans le muscle EOM, on observe une diminution d'expression au niveau du EOM au stade symptomatique. Entre autres, on note une diminution de l'expression de certaines protéines importantes pour la synthèse des acides gras et gestion des lipides (**cercle vert** : *MGLL*, *ACACA*, *PLINI*), de sous unités de canaux calciques voltages dépendent (**cercle bleu** *CACIS*, *CA2DI*), des protéines également impliquées dans la plasticité synaptique ou croissance axonale (**cercle bleu** : *SEMA3C*, *RAP1A*, *MPP6*, *CPNE1*, *PTBP2*), des protéines reliées au trafic des récepteurs couplés aux protéines G (**cercle orange** : *CNIH4*, *HIP1*) aux cytosquelettes (**cercle jaune** *TPPP*, *FHOD1*, *ARPC4*, *OBSLI*) ainsi qu'à la fonction mitochondriale (**cercle brun** : *GMPRI*, *NDUAB*, *NQO1*, *TMM11*) (Figure 3.13A).

Quelques aspects intéressants ressortent de cette analyse. Entre autres, une augmentation de l'expression des neurofilaments pourrait stabiliser l'axone et ainsi favoriser le maintien de l'innervation (Julien and Mushynski 1998). La diminution de l'expression de plusieurs protéines qui régulent négativement la transmission synaptique pourrait également représenter un mécanisme compensatoire favorisant le maintien de la JNM. Dans ces protéines, entre autres, deux enzymes (*MGLL* et *ABHD6*) responsables de la dégradation des endocannabinoïdes sont diminuées pouvant favoriser une augmentation de la signalisation des endocannabinoïde. Une augmentation des endocannabinoïdes a eu un effet protecteur dans le modèle SOD1^{G93A} en retardant et en diminuant le déclenchement et la progression de la SLA (Rodriguez-Cueto, Santos-Garcia et al. 2018). Un troisième aspect est la diminution de deux canaux calciques volages dépendants qui pourrait être bénéfique et limiter l'entrée excessive de calcium : élément déclencheur des mécanismes d'excitotoxicités.

En somme, certains processus cellulaires dans les muscles résistants tels les processus d'oxydoréduction, le tamponnage du calcium, l'homéostasie protéique ainsi que le maintien de certains éléments du cytosquelette axonal et synaptique pourraient octroyer cette résistance particulière des EOMs aux processus neurodégénératifs observés dans la SLA.

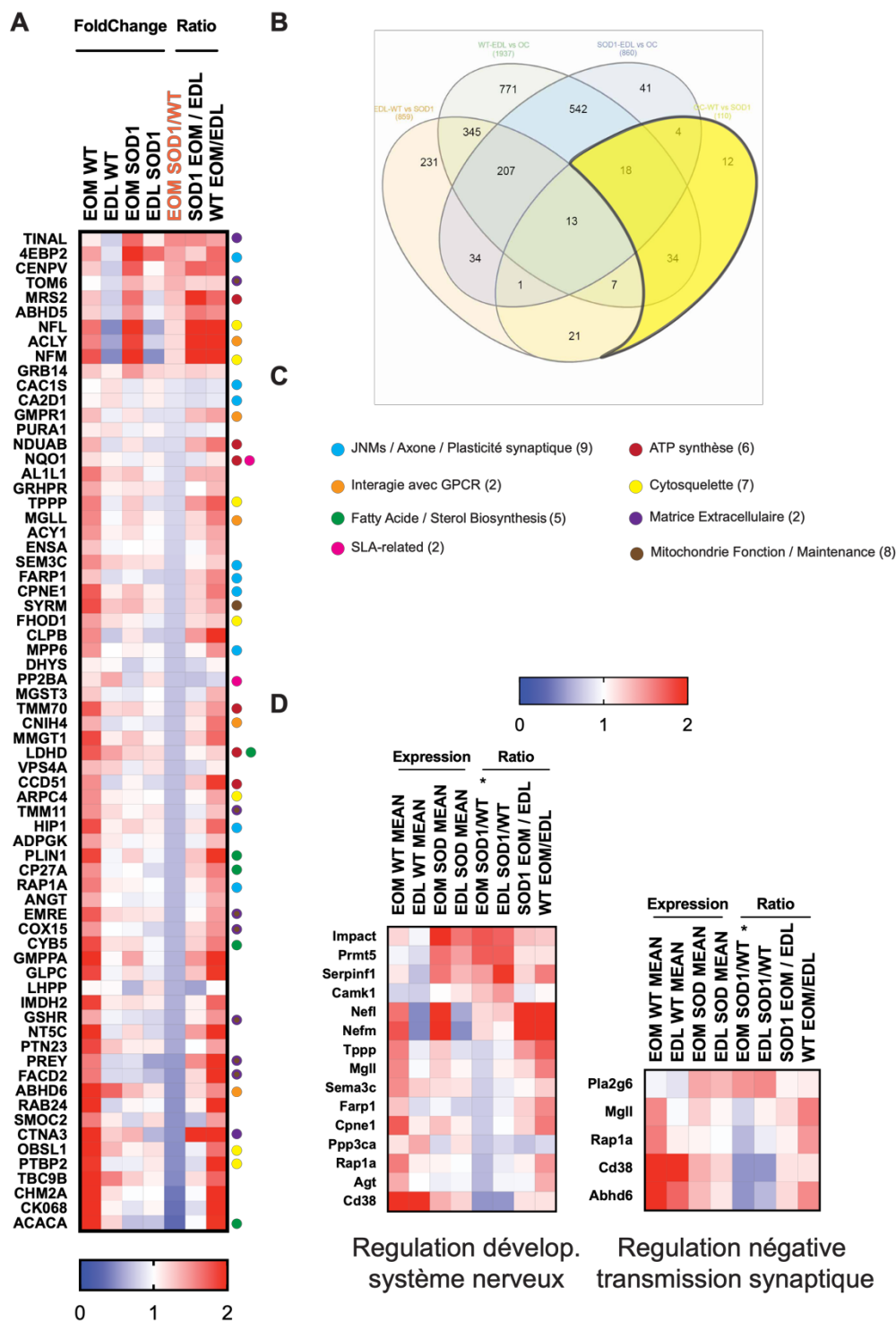


Figure 3.13 Profil d'expression de l'EOM dans la SLA

(A) Heat-map illustrant l'ensemble des protéines dont le niveau d'expression se distingue significativement chez l'EOM entre WT et SOD1 (68 protéines, p-value < 0.05 : Anova mixte) (B) Diagramme de Venn avec la distribution des différentes protéines dans les conditions expérimentales. (C) Fonctions de l'ensemble des protéines qui diffèrent spécifiquement chez l'EOM entre le WT et SOD1. (D) Heat-map illustrant les différents enrichissements fonctionnels des protéines qui diffèrent chez EOM WT et SOD1 (Tableau 3.9)

Chapitre 4 - Discussion

4.1 Résumé des résultats

Dans la SLA, la dénervation des JNMs ainsi que les altérations des fonctions des CSPs sont des phénomènes précoces qui apparaissent avant la mort des motoneurones. Le maintien des JNMs dans les muscles résistants tels les muscles extraoculaires est-il dû à la conservation des fonctions gliales? Dans le cadre de ce mémoire, il a été possible d'observer que la morphologie des jonctions neuromusculaires des muscles extraoculaires était maintenue même aux stades symptomatiques tardifs. Contrairement aux cellules de Schwann périssynaptiques des muscles vulnérables, les propriétés d'activation des CSPs à la JNM des muscles extraoculaires sont normales, ne présentant pas les caractéristiques d'hyperactivité. Cette capacité à décoder adéquatement l'activité synaptique pourrait suggérer le support glial approprié à la JNM. Finalement, comme rapporté par les expériences de protéomiques, l'expression de différentes protéines suggère ainsi la présence de mécanismes d'adaptations dans les EOMs permettant le maintien de certaines fonctions cellulaires et assurant la stabilité axonale et synaptique. À ma connaissance, ces travaux sont l'un des premiers à investiguer non seulement les changements du protéome au niveau des JNMs, mais également, s'intéressent aux fonctions des CSPs au niveau des EOMs dans la SLA.

4.2 Les muscles vulnérables : Dénervations, Réinnervation et Vulnérabilité sélective

Il est désormais clair que la vulnérabilité aux processus de dénervation des JNMs dans la SLA est présente. Cette vulnérabilité peut être associée à plusieurs éléments. Entre autres, la sécrétion de facteurs neurotrophiques dans des populations spécifiques de motoneurones, l'excitabilité neuronale spécifique à certaines unités motrices, la gestion différentielle de l'homéostasie protéique (mauvais repliement des protéines menant à la génération d'un stress du réticulum endoplasmique et l'aide des protéines chaperonnes), le métabolisme énergétique ainsi que des différences au niveau du transport protéique peuvent expliquer ces vulnérabilités (Ragagnin, Shadfar et al. 2019). Cette vulnérabilité se produit non seulement durant la dénervation des JNMs mais se déroule également durant les processus de réinnervation.

4.2.1 Les processus de dénervation dans les muscles vulnérables

Comme illustré à maintes reprises, la dénervation des JNMs est un phénomène précoce qui se produit avant la mort des motoneurones et touche distinctivement selon le type d'unité motrice (Pun, Santos et al. 2006). Ainsi, les JNMs des unités motrices FF dans le muscle EDL vont se dénervier précocement des unités motrices FR et S du muscle *soleus* (Tremblay, Martineau et al. 2017).

Dans ces travaux, l'analyse du profil d'expression protéique retrouvé spécifiquement et exclusivement dans le muscle EDL lors du stade symptomatique reflète bel et bien cette réalité. Les processus cellulaires cataboliques ainsi que ceux reliés aux fonctions du protéosome sont augmentés spécifiquement dans l'EDL (Figure 3.11; Tableau 3.9). Également, en investiguant les protéines qui se distinguent spécifiquement entre l'EDL et l'EOM dans les SOD1 aux stades symptomatiques, l'augmentation de l'expression de quelques protéines reliée avec une réorganisation synaptique est observée.

D'une part, quelques protéines exprimées lors des processus de dénervations des JNMs sont similairement augmentées dans l'EDL SOD1 au stade symptomatique. On peut noter l'augmentation de l'expression de la protéine « *Ankyrin repeat domain-containing protein 2* » et « *Carbonic anhydrase 3* » dont la première est augmentée dans les muscles dénervés dans la SLA (Nakamura, Nakada et al. 2002) et dont l'augmentation de la seconde est non seulement proportionnelle à la dénervation des JNMs (Milot, Fremont et al. 1991, Huang, Zhao et al. 2017) mais également, affecte la transmission synaptique en diminuant la vitesse de recyclage des vésicules synaptiques (Bertone, Groisman et al. 2017). De plus, on observe une augmentation des protéines induites suite à des lésions axonales. En effet, la protéine 14-3-3 dont l'expression est augmentée suite aux lésions axonales (Namikawa, Su et al. 1998) est davantage exprimée dans l'EDL SOD1 au stade symptomatique. De manière intéressante, cette protéine qui active les cascades moléculaires telles Raf-1 importantes pour la régénération axonale et pour la survie cellulaire (Namikawa, Su et al. 1998) est inhibée suite à sa séquestration par les agrégats de SOD1 mal repliée lui empêchant ainsi d'exercer sa fonction (Park, Jang et al. 2017).

Ainsi, ces processus cellulaires et les protéines mentionnées précédemment peuvent être associés à différentes fonctions : la dégradation des différents éléments musculaires menant à l'atrophie ainsi que les processus de dégradations cellulaires observées durant la rétraction axonale

dans les processus de dénervation (Namikawa, Su et al. 1998, Huang, Zhao et al. 2017, Lang, Aravamudhan et al. 2017). De manière intéressante, certains processus cellulaires retrouvés dans le profil protéique du muscle vulnérable sous-entendraient un processus compensatoire ou de tentative de réparation. Entre autres, la protéine 14-3-3 mentionnée antérieurement ainsi que la protéine *mitogen-activated protein kinase 12*, qui favorise l'expansion et l'amplification des cellules progénitrices des myocytes lors de la croissance ou la régénération musculaire (Chang, Sincennes et al. 2018). En ce sens, existe-t-il des processus de réparations induites présentement dans les muscles vulnérables et tentant de réparer le système?

4.2.2 Les processus de réinnervation dans les muscles vulnérables

Comme mentionné dans le chapitre I (section 1.5.3), le processus de dénervation observé dans la SLA est hautement dynamique. Il est possible d'observer non seulement une rétraction des terminaisons axonales, mais également un bourgeonnement axonal compensatoire de ces dernières, tout au long du processus dégénératif afin de tenter de réinnervier les JNMs dénervées (Martineau, Di Polo et al. 2018). Ainsi, on pourrait s'attendre à retrouver des éléments connus contribuant à ce phénomène. En effet, notre analyse du protéome dans l'EDL au niveau symptomatique sous-entend une certaine compensation. Comme illustré dans la Figure 3.11C, les processus de translation, de synthèse de macromolécules, des transports intracellulaires ainsi que des protéines retrouvées au niveau synaptique sont augmentées dans le muscle EDL au stade symptomatique. En ce sens, lors des processus de réinnervation, la synthèse de nouvelles protéines synaptiques (GO TERM : translation / génération de macromolécule / synapse) qui sont essentielles lors des processus régénératifs est augmentée et pourrait ainsi appuyer le phénomène de réinnervation compensatoire observé (Arbour, Tremblay et al. 2015, Tremblay, Martineau et al. 2017, Martineau, Di Polo et al. 2018). Également, en analysant les protéines qui sont spécifiquement distinctes entre EDL et EOM aux stades symptomatiques, des protéines qui régulent positivement la croissance des neurites telle la Thrombospondin-4 (*TSP4*) (Dunkle, Zaucke et al. 2007), la protéine cordon-bleu (*COBL*) (Ahuja, Pinyol et al. 2007), l'*Eukaryotic translation initiation factor 5A-1* (*IF5A1*) (Hannan, Mohibbullah et al. 2017) et *PDZ and LIM domain protein 3* (*PDLM3*) (Shimizu, Pastuhov et al. 2018) est spécifiquement augmentée dans l'EDL au stade symptomatique (Figure 3.10, Tableau S1 en annexe).

Ces expériences de protéomiques nous permettent d'identifier de nouvelles potentielles cibles thérapeutiques qui pourraient faire l'objet d'études subséquentes. *TSP4* est une protéine présente à la fois à la JNM et au niveau du SNC dont l'expression est augmentée suite à la dénervation (Dunkle, Zaucke et al. 2007). *TSP4* agit sur la matrice extracellulaire, et, via son interaction avec les laminines, va promouvoir la croissance axonale (Dunkle, Zaucke et al. 2007). De manière intéressante, *TSP4* peut être sécrétée par les astrocytes ce qui favorise la formation de synapses (Risher and Eroglu 2012, Risher, Kim et al. 2018). Ainsi, *TSP4* représente une cible intéressante par sa présence à la JNM et son implication déjà reportée dans les cellules gliales. Des études subséquentes sur les cibles de *TSP4* et les fonctions à la JNM pourraient nous éclairer sur des mécanismes potentiels pouvant favoriser la croissance axonale. Notre protéomique a permis d'identifier plusieurs laminines qui sont, dans la majorité des cas, exprimées davantage dans les muscles résistants que dans les muscles vulnérables. De ce fait, malgré que *TSP4* est augmentée dans les muscles vulnérables favorisant ainsi la croissance axonale de ce système en dénervation, ses cibles semblent toutefois exprimées davantage dans les muscles résistants pouvant ainsi expliquer l'incapacité d'assurer adéquatement la réinnervation dans les muscles vulnérables.

En somme, certaines cascades moléculaires sous-entendraient que malgré la dénervation qui se produit actuellement, certains mécanismes compensatoires seraient en place et tenteraient de réinnervier le système. Malgré toutes ces tentatives de réinnervation, certains facteurs intrinsèques cellulaires peuvent nuire aux bons déroulements des processus de réinnervation et mèneraient aux finals à leur vulnérabilité sélective à la dénervation des JNMs.

4.2.3 Vulnérabilité sélective – Facteurs neurotoxiques

Récemment, l'utilisation de la technique de l'isolation des motoneurones par capture laser a permis d'investiguer spécifiquement le protéome des différentes populations de motoneurones. Chez les MNs vulnérables tels que ceux de la corne ventrale dans la moelle épinière et/ou des motoneurones de l'hypoglosse ainsi que les motoneurones résistants tels que des noyaux oculomoteurs ou du noyau Onuf au niveau de la moelle épinière sacrale ont été isolés. Ceci a permis de découvrir quelques gènes qui pourraient contribuer à la vulnérabilité sélective.

D'une part, quelques candidats pouvant expliquer la vulnérabilité sélective des MN spinaux et de l'hypoglosse seraient la semaphorine 3A (Sema A3), le *Ephrin type-A receptor 4 (EPHA4)* ainsi que la matrice metalloproteinase 9 (*MMP9*) (Ragagnin, Shadfar et al. 2019). Sema A3 est une

protéine essentielle à la guidance axonale lors de la neurogenèse, qui, via son récepteur neuropilin 1 (*NRPI*), repousser les axones en croissance (Huber, Kania et al. 2005, Moret, Renaudot et al. 2007). L'expression de Sema A3 est également augmentée au niveau des CSPs des JNMs des unités motrices FF les plus vulnérables dans les modèles murins ce qui pourrait en ce sens empêcher les processus de réinnervation (De Winter, Vo et al. 2006). L'utilisation d'un anticorps dirigé vers *NRPI* a diminué la dénervation des JNMs (Venkova, Christov et al. 2014). Dans le même ordre d'idée, *EPHA4* inhibe les processus de réinnervation, une augmentation de l'expression d'*EPHA4* est reportée dans les motoneurons vulnérables et son expression corrèle également avec les symptômes (Van Hoecke, Schoonaert et al. 2012). Ainsi, plusieurs acteurs différents tels la Sema A3 ou l'*EPHA4* pourraient contribuer à la vulnérabilité des muscles vulnérables en empêchant les processus de réinnervation.

Finalement, une autre protéine pouvant contribuer à la vulnérabilité particulière à la dénervation est la *MMP9*, une endopeptidase qui dégrade la matrice extracellulaire et la membrane basale (Rochat, Bernard-Marissal et al. 2016). Le gène de la *MMP9* est exprimé spécifiquement au niveau des motoneurons vulnérables et le « *knock out* » ou la surexpression virale dans un modèle murin vont respectivement ralentir ou accélérer le processus de dénervation affectant grandement la survie (Kaplan, Spiller et al. 2014). L'expression de *MMP9* peut être modulée par plusieurs facteurs. Il a été observé que l'inhibition de l'expression de la protéine *Diaphanous homolog 1* (*DIAP1*) dans les glioblastomes empêche la migration des glioblastomes en diminuant l'expression de *MMP2* et *MMP9*. Au stade symptomatique de la SLA, une augmentation de l'expression de *DIAP1* est observée dans le muscle EDL versus EOM (Figure 3.10A). Ceci sous-tendrait ainsi un mécanisme supplémentaire favorisant la vulnérabilité. Cependant, l'implication de *MMP9* semble être spécifique aux muscles vulnérables. En effet, l'augmentation spécifique de *MMP9* dans les MNs des muscles extraoculaires n'a pas enclenché les mécanismes de dénervation suggérant ainsi que le mécanisme de résistance des oculomoteurs proviendrait de d'autres facteurs (Kaplan, Spiller et al. 2014). En somme, certains muscles possèdent une vulnérabilité particulière aux processus de dénervations dus à l'expression de certaines protéines favorisant la dénervation et/ou empêchant une réinnervation adéquate des JNMs. Ainsi, quel mécanisme favorise le maintien des JNMs dans les muscles extraoculaires?

4.3 Les muscles extraoculaires: adaptabilité menant à une atteinte tardive?

Grâce à l'avancement des technologies dans le domaine médical, il est désormais possible de maintenir artificiellement en vie pendant de nombreuses années les patients le désirant. Chez certains de patients souffrant de la SLA, une atteinte des fonctions des oculomoteurs est acquises avec le temps chez les patients dont la vie est prolongée via ces techniques. Dans la section subséquente, les différents éléments appuyant l'existence de mécanismes cellulaires favorisant le maintien des JNMs des muscles oculomoteurs tels une expression différentielle de certaines protéines ainsi que le maintien des fonctions gliales seront abordées.

4.3.1 Atteintes morphologiques tardives

Comme illustrent les expériences présentées dans ce mémoire, à un stade très tardif de la maladie, les JNMs des muscles extraoculaires ne sont pas touchées malgré qu'il y ait une forte perte de poids ainsi que perte de fonction motrice. En effet, l'innervation des JNMs des muscles extraoculaires ne diffère pas des souris WT à ce stade de la maladie (section 3.1). Cependant, s'il avait été possible de maintenir les animaux sous respirateur artificiel, aurions-nous pu voir une atteinte plus tardive dans les muscles oculomoteurs?

Les premiers cas de patients possédants des atteintes des muscles extraoculaires ont été reportés dans les années 90 suite à l'utilisation de ventilateurs artificiels pour les maintenir en vie (Mizutani, Sakamaki et al. 1992). Des études subséquentes ont démontré certaines altérations au niveau morphologique ainsi qu'au niveau de la fonction. La présence de fibres hypertrophiques et atrophiques, des changements au niveau de l'expression de myosines (Ahmadi, Liu et al. 2010) ainsi que la diminution de l'expression de laminine importante pour le maintien de la JNM (Liu, Brännström et al. 2011) sont observées dans les muscles EOM (section 1.3.4.2). Cependant, malgré que quelques altérations de myosine et de laminines aient été reportées, les JNMs des muscles extraoculaires demeurent remarquablement maintenus tout comme observé chez notre modèle murin à un stade très avancé de la maladie (section 3.1). Ainsi, quel mécanisme pourrait ainsi leur conférer cette résistance?

4.3.2 Mécanismes cellulaires pouvant expliquer le maintien des EOMs

Le maintien de la morphologie ainsi que l'innervation des JNMs demeurent présents dans les muscles extraoculaires, et ce à des stades très tardifs. Certaines particularités dans son protéome, dans le maintien des cellules gliales avoisinantes (section 4.3.3) ainsi qu'une modulation du système des endocannabinoïdes (section 4.3.4) pourraient, en somme, minimiser les facteurs neurotoxiques et favoriser le maintien de la JNM.

4.3.2.1 Expression différentielle de SOD1

Une des différences flagrantes qui a été rapportée suite à l'analyse du protéome des préparations neuromusculaires résistantes et vulnérables est l'expression différentielle de la protéine SOD1. Comme entendu, la protéine SOD1 est surexprimée dans les deux muscles comparativement aux WT, ce qui est cohérent pour un modèle surexprimant la protéine SOD1 mutée. De manière surprenante, elle est plus élevée chez le muscle EDL, le muscle vulnérable, que l'EOM, le muscle résistant. Ceci est intéressant, car la diminution du nombre de copies du transgène SOD1^{G37R} corrèle avec une progression de la maladie plus tardive (Zwiegers, Lee et al. 2014). Ainsi, cette différence d'expression du transgène SOD1 pourrait avoir moins de répercussions sur les mécanismes pathogéniques observés dans les muscles extraoculaires et expliquer cette atteinte plus tardive. Ainsi, observe-t-on des différences dans les mécanismes pathogéniques proposées (section 1.2.3.5) telles l'excitabilité neuronale, l'excitotoxicité glutamatergique, ou sur le maintien des compartiments axonaux et synaptiques?

4.3.2.2 Maintien de l'excitabilité neuronale

L'excitabilité neuronale et la propagation des potentiels d'action sont possibles dû au maintien du gradient ionique dans les motoneurones grâce au fonctionnement des pompes Na⁺/K⁺ ATPase. Il existe plusieurs isoformes de cette pompe qui ont une expression distincte selon le type d'unité motrice : les motoneurones FF vont exprimer l'isoforme $\alpha 3$, les motoneurones FR vont exprimer $\alpha 1$ et $\alpha 3$ tandis que les motoneurones S expriment uniquement l'isoforme $\alpha 2$ (Rueggsegger, Maharjan et al. 2016). Les protéines SOD1 mutées mal repliées interagissent spécifiquement avec l'isoforme $\alpha 3$ des MNs FF menant à une dysfonction de la pompe (Rueggsegger, Maharjan et al. 2016). Cette dysfonction mène à une altération du gradient électrochimique qui est délétère dans la transmission neuronale suggérant ainsi une certaine susceptibilité supplémentaire de ces unités motrices. De manière intéressante, l'analyse

protéomique n'a pas détecté d'altération des isoformes dans le muscle vulnérable comme retrouvé chez les patients SLA (Rueggsegger, Maharjan et al. 2016). Toutefois, l'expression des isoformes $\alpha 1$, $\alpha 2$, et $\alpha 3$ sont non seulement présent dans l'EOM, mais également doublé entre l'EOM et EDL tant chez le WT que chez les SOD1. Ainsi, puisque les protéines SOD1 mutées mal repliées interagissent spécifiquement avec l'isoforme $\alpha 3$, la présence des deux autres isoformes pourrait compenser et favoriser le maintien de l'excitabilité neuronale des EOMs. Le maintien de l'excitabilité neuronale pourrait être neuroprotectrice puisque l'augmentation de l'excitabilité des motoneurones a permis de renverser l'accumulation des protéines mal repliées (Saxena, Roselli et al. 2013). Ainsi, le maintien de l'excitabilité via l'expression des différentes isoformes des pompes Na^+/K^+ ATPase pourrait être un élément favorisant cette résistance des motoneurones oculomoteurs. Cependant, les MNs des EOMs sont-ils protégés par une activation excessive?

4.3.2.3 Excitotoxicité glutamatergique

Comme mentionné précédemment, il a été possible d'observer une hyperactivation des MNs supérieurs corticaux menant à une relâche excessive glutamatergique induisant une excitotoxicité au niveau des MNs inférieurs activant les cascades apoptotique (section 1.2.3.5.1). De manière intéressante, l'une des principales différences neuroanatomiques entre les motoneurones vulnérables spinaux et de l'hypoglosse en comparaison aux motoneurones résistants de l'oculomoteur et du noyau Onuf est leur innervation corticale. En effet, les EOMs ainsi que les motoneurones du noyau Onuf se trouvant dans la moelle épinière sacrale ne reçoivent aucune innervation directe des motoneurones corticaux (Eisen, Braak et al. 2017). Cette résistance aux processus d'excitotoxicité peut être due à des distinctions de leur environnement cellulaire telle la présence d'innervation corticale ou la présence de cellules gliales avoisinantes qui accentue les mécanismes toxiques. Un autre facteur pouvant suggérer une certaine résistance aux processus d'excitotoxicité est leur capacité à tamponner le médiateur des cascades de l'apoptose cellulaire : le calcium.

Le calcium entre au niveau des motoneurones de diverses façons : à travers des récepteurs tels NMDA ou à travers des canaux voltage dépendant dont le canal Ca^{2+} voltage-dépendant type L (Xu and Lipscombe 2001). Ce dernier qui génère un courant calcique entrant est exprimé davantage dans les motoneurones spinaux que les motoneurones des oculomoteurs (Shoenfeld, Westenbroek et al. 2014). De manière intéressante, une diminution de l'expression de sous-unité

1S des canaux calciques L-type (*CACIS*) ainsi que de la sous-unité $\alpha 2\delta$ -1 des canaux calciques voltage-dépendant (*CA2DI*) sont observée dans notre protéomique à deux conditions : entre EOM SOD1 symptomatique et EOM WT ainsi qu'entre EOM SOD1 et EDL SOD1. Dans les deux conditions, ce changement d'expression pourrait mener à une réduction de l'entrée calcium spécifique dans les EOMs au stade symptomatique de la SLA.

Il est important de garder en tête que la protéomique reportée dans ces travaux comprend les différents éléments neuromusculaires et que l'excitotoxicité discutée se retrouve spécifiquement au niveau des MNs. Ainsi cette adaptation des muscles extraoculaires pourrait bel et bien représenter une certaine adaptabilité et protection aux processus d'excitotoxicité en limitant l'entrée excessive de calcium et en limitant l'activation des cascades apoptotiques dans les MNs. Cependant, ceci pourrait également représenter une adaptation au niveau de cellules musculaires dont le couplage excitocontraction est médié entre autres par les canaux calciques (Flucher and Campiglio 2019), ou représenter une adaptation des CSPs qui expriment également les canaux calciques voltage dépendant de type L (Robitaille, Bourque et al. 1996). De manière intéressante, *CA2DI* serait un excellent candidat pour des études subséquentes dû à son implication dans la transmission et plasticité synaptique dans des conditions pathologiques au niveau de la moelle épinière. Lors des lésions de nerfs périphériques, une augmentation de la contribution des canaux calciques de type L à la transmission synaptique est observée dans la moelle épinière due à l'augmentations de l'expression la sous-unité *CA2DI* (Alles, Garcia et al. 2018). Également, dans les douleurs neurologiques, l'hyperexcitabilité des neurones sensitifs menant aux mécanismes de sensibilisation est due entre autres par *CA2DI* (Park, Yu et al. 2016). Ainsi, une expression différentielle des canaux calciques pourrait être un excellent candidat menant à une adaptation des EOMs aux mécanismes d'excitotoxicité ou induisant une adaptation synaptique menant au maintien des éléments des JNMs. Malgré tout, d'autres mécanismes intracellulaires peuvent assurer une meilleure gestion du calcium et peuvent protéger les neurones de la mort cellulaire induite par ce dernier.

Plusieurs protéines intracellulaires sont en mesure de lier le calcium, agissent comme des chélateurs endogènes du Ca^{2+} et sont importantes afin de protéger les neurones de la mort cellulaire induite par la présence excessive de cet ion (Kohr and Mody 1991). En effet, les protéines telles la calbindine D28K ainsi que la parvalbumine tamponnent le calcium et exercent un effet neuroprotecteur (Chard, Bleakman et al. 1993). Une des études pionnières a révélé l'absence de

ces protéines dans les populations de motoneurones vulnérables tandis qu'elles étaient exprimées davantage dans les populations résistantes chez les patients SLA (Alexianu, Ho et al. 1994). Cependant, des résultats opposés à ceci ont été rapportés dans une étude plus récente ainsi qu'au niveau de la protéomique dans ce mémoire. En effet, dans le modèle murin SOD1^{G93A}, un niveau plus bas de parvalbumin est observé dans les noyaux des oculomoteurs comparativement aux motoneurones de la moelle épinière (Comley, Nijssen et al. 2016). Au niveau du protéome des préparations neuromusculaires des EOMs versus l'EDL de ses travaux, le niveau de parvalbumin est plus élevé dans l'EDL comparativement au EOM chez le WT et chez le SOD1 : des différences d'expression au niveau musculaires, neuronales ou gliales pourraient expliquer ceci. En résumé, certaines distinctions concernant l'excitotoxicité et la gestion du calcium entre les muscles résistants et vulnérables ont été reportées et pourraient expliquer la résistance particulière des MNs des noyaux oculomoteurs aux processus de neurodégénération. Cependant, d'autres investigations sont de mise pour établir les autres mécanismes cellulaires responsables de cette résistance. En effet, l'inhibition des cascades apoptotiques activées par l'excitotoxicité glutamatergique dans les motoneurones des modèles SOD1 a malgré tout induit des changements morphologiques des JNMs (Gould, Buss et al. 2006). Une dénervation des JNMs a été observée malgré l'inactivation des mécanismes d'apoptose dans les MNs suggérant ainsi l'existence de d'autres mécanismes responsables du démantèlement de la JNM et du maintien de la morphologie synaptique observée dans les muscles résistants.

4.3.2.4 Maintien des éléments synaptiques et axonaux

Les neurofilaments (NFs) sont des filaments intermédiaires se trouvant spécifiquement dans les axones. Il existe trois types de neurofilaments qui se distinguent entre autres par leur poids moléculaire : neurofilament lourd (NF-H), neurofilament moyen (NF-M) et neurofilament léger (NF-L). Ces derniers vont combler principalement trois fonctions : déterminer le diamètre des axones myélinisés, moduler le transport axonal et assurer la croissance axonale suite à une lésion neuronale (review (Julien and Mushynski 1998)). Chez les patients SLA, des agrégats des neurofilaments dans les motoneurones (Carpenter 1968) ainsi qu'une diminution de plus de 60% des ARNm de NF-L ont été reportés (Bergeron, Beric-Maskarel et al. 1994). Y aurait-il des différences dans l'expression des neurofilaments entre les muscles vulnérables et les muscles résistants? Dans les présents travaux, malgré que les trois neurofilaments soient plus élevés chez l'EOM versus l'EDL dans les deux conditions (WT et SOD) il est possible d'observer dans le

protéome des muscles extraoculaires une augmentation de NF-L ainsi que de NF-M spécifiquement chez les SOD symptomatique comparativement au WT. Quelle est l'implication de ces différences? Deux phénomènes pourraient être découler de cette différence d'expression protéique : le maintien de la stabilité et du transport axonal ainsi que de la stabilisation synaptique.

4.3.2.4.1 Stabilité et transport axonal

Dans un premier temps, la présence anormale des agrégats de neurofilaments reportée dans les motoneurones des patients SLA a suggéré des atteintes potentielles au niveau de la stabilité de l'axone ainsi qu'au niveau de transport axonal qui pourraient mener à la neurodégénération des MNs (Hirano, Donnenfeld et al. 1984). Plusieurs études ont démontré que l'accumulation pouvait mener à des déficits dans le transport antérograde et rétrograde dans les modèles SOD1 (Williamson and Cleveland 1999, Ralph, Radcliffe et al. 2005) ainsi que les modèles TDP-43 de la SLA (Alami, Smith et al. 2014). Plusieurs facteurs peuvent mener à des déficits dans l'assemblage et menant à l'agrégation des neurofilaments : une dérégulation au niveau de la transcription du gène, une dérégulation dans la maturation des neurofilaments ainsi que des modifications post-traductionnelles inadéquates telle la phosphorylation ou glycosylation des neurofilaments (Chou, Wang et al. 1998). De plus, l'accumulation des neurofilaments mène à une désorganisation de l'arborisation dendritique des neurones moteurs dans la moelle épinière (Kong, Tung et al. 1998). Ainsi, les neurofilaments sont des éléments primordiaux pour la morphologie et la stabilité des neurones.

Dans certains modèles murins, l'augmentation des neurofilaments mène à un déficit de leur transport, à un gonflement de l'axone suivi d'une axonopathie et d'une atrophie musculaire : similaire aux phénomènes observés dans la SLA (Cote, Collard et al. 1993, Julien, Cote et al. 1995). De manière intéressante, l'expression de NF-L et NF-M est augmentée dans les muscles extraoculaires au stade symptomatique de la SLA. Quelle répercussion l'augmentation des neurofilaments peut avoir sur le maintien de la JNM qui est à l'opposé des effets délétères observés dans les modèles mentionnés précédemment. Un aspect important qui pourrait expliquer une augmentation des neurofilaments sans les effets délétères est le maintien de la stoechiométrie des neurofilaments. En effet, l'interaction des différents NFs forme une structure tridimensionnels primordiales pour effectuer leur fonction cellulaire (Yuan, Rao et al. 2017). Ainsi, dans les modèles énoncés précédemment, il a été possible de contrecarrer les altérations observées en rétablissement

le ratio des différents neurofilaments pour maintenir une stœchiométrie adéquate (Marszalek, Williamson et al. 1996, Julien and Mushynski 1998, Kong, Tung et al. 1998). Des études subséquentes sont essentielles afin de valider deux éléments : la présence d'agrégats de neurofilaments dans les axones ainsi que les modifications post-traductionnelles des neurofilaments. En effet il serait possible que dans les muscles extraoculaires, l'absence d'agrégats, l'augmentation de l'expression des neurofilaments gardant le ratio optimal ainsi que les modifications post-traductionnelles adéquates favorise le maintien et la stabilité axonale et des transports le long des éléments du cytosquelette. Suite aux récentes découvertes des fonctions des neurofilaments au niveau synaptique, il serait possible que cette augmentation des neurofilaments favorisant également le maintien des synapses.

4.3.2.4.2 Stabilité synaptique

Depuis plusieurs années, la présence des neurofilaments au niveau des synapses a été un sujet en discussion. Initialement, puisque les neurofilaments semblaient être dégradés à leur arrivée aux synapses, leurs fonctions dans ce compartiment cellulaire ont été écartées (Roots 1983). Récemment, Yuan et al. (2015) ont été en mesure de démontrer la présence de ces neurofilaments au niveau des synapses (Yuan, Serksen et al. 2015). Les NFs peuvent interagir avec les récepteurs glutamatergiques NMDA ainsi que dopaminergique D1 et permettent le recyclage des récepteurs à la synapse ainsi que le maintien de la LTP (Kim, Ariano et al. 2002, Yuan, Rao et al. 2017). Par exemple, NF-M va ancrer les endosomes contenant les récepteurs D1 et assure leur recyclage à la synapse suite à une stimulation (Kim, Ariano et al. 2002). Les processus de plasticité synaptique sont également influencés par les filaments intermédiaires : l'inhibition de NF-H empêcherait la maintenance de la LTP en diminuant les épines dendritiques ainsi qu'en diminuant l'encrage et l'expression des récepteurs glutamatergiques, dont les récepteurs NMDA (Yuan, Rao et al. 2017). En ce sens, les neurofilaments seraient également importants pour la maintenance des synapses et les processus de plasticité. Or, les études citées précédemment investiguent les synapses du SNC et les effets relatés sont principalement au niveau des neurones postsynaptiques. D'autres investigations du rôle des neurofilaments à la JNM devront être effectuées pour déterminer si les neurofilaments interviennent dans la stabilisation de l'élément présynaptique et si l'augmentation observée au niveau des EOMs au stade symptomatique favorise la stabilité synaptique. En plus des neurofilaments, un autre élément à la JNM pourrait être responsable de favoriser la stabilité de cette synapse tripartite : la cellule de Schwann périnervale.

4.3.3 Les cellules de Schwann périssynaptique et leur rôle dans la SLA

Le maintien de la morphologie et des fonctions synaptiques est permis grâce aux communications bilatérales adéquates des différents éléments de la synapse tripartite. Les CSPs qui sont en mesure de détecter et de moduler l'activité synaptique, elles sont également essentielles pour les processus de réparation ainsi que pour la stabilisation des JNMs (section 1.4). De manière intéressante, les CSPs sont en mesure de réguler les éléments discutés précédemment : les processus de réinnervation (section 4.2.2), les facteurs neurotoxiques menant à une vulnérabilité (section 4.2.3) ainsi que la stabilité synaptique observée (section 4.3.5.2). Dans la section qui suit, plusieurs thèmes seront abordés. D'une part, le rôle et l'implication dans la stabilité et les processus de réparations des JNMs par les CSPs.

4.3.3.1 Décodage synaptique des CSPs : atteinte différentielle dans les muscles vulnérables versus résistants

Les CSPs détectent et décodent l'activité synaptique grâce à leur récepteur métabotropiques muscariniques et purinergiques. Une augmentation de la signalisation calcique des CSPs dans la SLA a été observée dans le modèle murin SOD1^{G37R} 120 jours postnatals et persiste tout au long de la progression de la maladie (Arbour, Tremblay et al. 2015). Cependant, les explications derrière cette altération demeurent encore à définir : une augmentation de la densité des mAChR ou une augmentation des cascades des protéines G suite à l'activation des récepteurs métabotropiques muscariniques menant à une libération supérieure du calcium intracellulaire pourraient expliquer cette augmentation de la signalisation calcique suite à l'activation des CSPs. Notre hypothèse est que le décodage inadéquat de l'activité synaptique des CSPs par cette hyperactivation muscarinique est néfaste à l'enclenchement des processus de réparation de la JNM.

Chez les muscles vulnérables innervés par des MNs spinaux, des différences au niveau de la sensibilité aux agonistes et à l'activation des CSPs lors de stimulation induisant la relâche endogène des neurotransmetteurs sont observés et varient selon le type d'unité motrice. Initialement, une augmentation de la contribution muscarinique est observée dans toutes les unités motrices les plus vulnérables aux plus résistantes (FF, FR, S) (Arbour, Tremblay et al. 2015, Martineau, Arbour et al. in prep) et également une diminution de la signalisation purinergique dans les plus vulnérables (FF) (Martineau, Arbour et al. in prep). Cependant, ces investigations ont été effectuées sur des muscles qui vont tôt ou tard avoir une dénervation des JNMs. Que se passe-t-il dans les muscles extraoculaires?

Au niveau des muscles extraoculaires, la sensibilité des CSPs aux différents agonistes se distingue des muscles vulnérables. En effet, la sensibilité des CSPs à la muscarine (section 3.2.1) ainsi qu'à l'ATP (section 3.2.2) ne sont pas altérées dans le modèle murin. Malgré que ceci sous-entend que la capacité des CSPs à décoder l'activité synaptique ne serait pas altérée dans les muscles résistants, des expériences subséquentes seront nécessaires afin de confirmer ceci. En effet, il sera essentiel de déterminer comment les CSPs répondent suite à la relâche endogène des neurotransmetteurs puisque ceci va nous permettre d'évaluer quels récepteurs métabotropiques (muscarinique ou purinergique) détectent l'activité synaptique. Ces expériences clés permettront de valider si la contribution muscarinique ou purinergique est altérée ou adaptée dans les muscles extraoculaires. Malgré tout, un premier signe de maintien de la fonction des CSPs des EOMs est observé pour les deux NTs suggérant ainsi une détection adéquate de l'environnement synaptique.

4.3.3.2 Hyperactivation muscarinique – Phénomène protecteur ou délétère

Comme mentionné précédemment, les CSPs, via leurs récepteurs métabotropiques, détectent l'activité synaptique et suite à leur activation, adaptent leur phénotype pour maintenir la JNM ou pour favoriser les mécanismes de réparations (section 1.4.5.2). Ainsi, est-ce que la contribution excessive muscarinique observée dans les muscles vulnérables est un phénomène protecteur ou délétère au maintien et à la réparation des JNMs?

La signalisation des récepteurs muscariniques des CSPs est essentielle pour le maintien de la JNM ainsi que pour les mécanismes de réparations lors de la réinnervation. Une ablation spécifique des CSPs mène à la désorganisation des AChR ainsi qu'à la rétraction de la terminaison axonale à la JNM (Reddy, Koirala et al. 2003). Un phénomène similaire a été observé : le blocage chronique des récepteurs muscariniques des CSPs a mené à une déstabilisation des JNMs (Wright, Potluri et al. 2009). Ainsi, l'activation des CSPs via leurs récepteurs muscariniques est essentielle pour le maintien de la JNM.

Également, les CSPs réagissent et adaptent leur phénotype selon le contexte synaptique grâce à la détection du signal synaptique. En effet, lors des processus dégénératifs axonaux, les CSPs génèrent des prolongements qui sont également observée suite au blocage de la transmission synaptique (Georgiou, Robitaille et al. 1994, Son and Thompson 1995). Cette adaptation morphologique est abolie lors de l'activation des récepteurs muscariniques (Georgiou, Robitaille et al. 1994, Georgiou, Robitaille et al. 1999). Ainsi, les CSPs adaptent leur morphologie selon le

contexte synaptique via leurs récepteurs métabotropiques décodant la transmission synaptique. Le degré d'activation des récepteurs muscariniques dans la CSP peut donc favoriser soit la stabilité de la JNM ou favoriser les phénomènes de réparations de la JNM. En ce sens, quelle est la répercussion de cette hyperactivation des récepteurs muscariniques sur la stabilité des JNMs et/ou des processus de régénérations?

4.3.3.2.1 Phénomène protecteur de l'hyperactivation muscarinique

Dans un premier temps, l'hyperactivation des cascades cellulaires des récepteurs muscariniques pourrait être un phénomène protecteur qui promeut la stabilité des JNMs. De manière intéressante, dans les muscles vulnérables, l'augmentation de l'activité des récepteurs muscariniques corrèle avec le degré de résistances : les unités motrices qui dénervent plus tardivement dont le type S et FR ont un niveau d'activation des récepteurs muscariniques plus élevé (Arbour, Tremblay et al. 2015) que dans les unités motrices plus vulnérables FF (Martineau, Arbour et al. in prep). En ce sens, ceci pourrait représenter un effet compensatoire et favoriser ainsi la stabilité des JNMs.

Cependant, cette corrélation n'est pas respectée dans les muscles extraoculaires. L'activation des récepteurs muscariniques n'est pas augmentée dans les CSPs des muscles extraoculaires (section 3.1) malgré qu'ils soient au final les UMs les dernières touchées. Deux hypothèses possibles pourraient expliquer cette différence. D'une part, les CSPs des JNMs des muscles extraoculaires pourraient être adaptées et aucune altération de la signalisation muscarinique des CSPs ne serait observée. D'un autre part, puisque ceci est un phénomène qui arrive avant la dénervation (plus de 330 jours dans le *soleus* chez la souris SOD1^{G37R}), il serait possible qu'une altération de l'activation des récepteurs muscariniques puisse être observée dans les EOM un jour et que la fenêtre temporelle des altérations synaptiques ne soit que tout simplement extrêmement retardée. Ainsi, d'autres investigations afin de déterminer l'une ou l'autre des possibilités doivent être conduites.

Somme tout, malgré qu'une hyper activation muscarinique pourrait favoriser le maintien de la JNM à court terme, ceci semble être un phénomène biphasique : neuroprotecteur durant les stades présymptomatiques, mais qui deviennent délétères en nuisant aux mécanismes de réparations à la JNM lors de la progression de la SLA.

4.3.3.2.2 Phénomène délétère de l'hyperactivation muscarinique

Il a été postulé précédemment que l'hyperactivation muscarinique pourrait être un phénomène permettant de maintenir les différents éléments synaptiques de la JNM. Or, lors des processus de dénervation observés dans la SLA, est-ce que les CSPs adoptent un phénotype favorisant la réparation des JNMs?

Pour répondre à cette question, une étude récente effectuée au sein de notre laboratoire a induit une lésion neuronale dans le modèle SOD1^{G37R} au stade présymptomatique de la SLA. Cette intervention a permis d'évaluer la capacité aux CSPs à adopter un phénotype favorisant les processus de réparations neuronales mentionnés précédemment (section 1.4.5.2). Ces travaux ont pu mettre en évidence plusieurs éléments sous-entendant une réponse inadéquate à la dénervation des CSPs. Habituellement, lors d'une lésion neuronale, les CSPs de la plaque motrice dénervée vont faire des prolongements gliaux dirigés vers une plaque motrice innervée adjacente afin de favoriser un bourgeonnement de la terminaison axonale pour réinnerver la plaque motrice dénervée temporairement (Son and Thompson 1995). Cependant, le phénomène inverse est observé. En effet, des prolongements gliaux désorganisé et exempt de bourgeonnement axonal terminal sont observés (Arbour, Tremblay et al. 2015, Martineau, Arbour et al. in prep). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer ceci. Entre autres, comme mentionné précédemment (section 4.2.3), les unités motrices FF expriment la *SEMA3A*, une molécule chémo-répulsive empêchant la croissance axonale, spécifiquement exprimée dans les CSPs de ces unités motrices (De Winter, Vo et al. 2006). Cependant, ce phénomène est observé dans toutes les UMs suggérant ainsi la présence de d'autres facteurs qui empêchent la formation de bourgeonnement axonal terminal qui favorise habituellement la réinnervation des JNMs dénervées.

Un second mécanisme altéré dans les CSPs ne favorisant pas les processus de régénération axonale est en lien avec le nettoyage des débris axonaux. Lors des processus de réparation de la JNM, une phagocytose par les cellules gliales et les macrophages des débris axonaux permettent le retour de l'axone à la plaque motrice : ce phénomène est essentiel pour un processus de réinnervation optimal (Kang and Lichtman 2013). Galectine-1 et Galectine-3 sont des protéines importantes pour attirer les macrophages vers les sites contenant les débris cellulaires et dont l'augmentation d'expression est associée avec les mécanismes de phagocytose par les cellules gliales (Plachta, Annaheim et al. 2007, Morizawa, Hirayama et al. 2017). Or, l'expression de Galectine-3 n'est pas augmentée dans les CSPs suite à lésion neuronale suggérant ainsi que les

CSPs sont inadéquates pour effectuer le nettoyage des débris axonaux (Martineau, Arbour et al. in prep). De manière intéressante, Galectine-1 a été identifié dans les expériences de protéomique. Brièvement, Galectine-1 est augmentée spécifiquement dans les muscles vulnérables aux stades symptomatiques de la SLA versus chez l'animal sain. Cette augmentation peut s'expliquer par le processus en cours de dénervation dans les muscles vulnérables lors des phases symptomatiques de la SLA qui n'est pas enclenchée dans les muscles résistants. Il est important de noter que Galectine-1 est exprimé non seulement dans les CSPs mais également dans les cellules de Schwann myélinisé (Plachta, Annaheim et al. 2007). D'autres investigations afin de déterminer spécifiquement la localisation cellulaire de ce changement dans le protéome seront essentielles. En effet, une incapacité des CSPs à assurer les processus de phagocytose gliale pourrait être masquée par l'expression de Galectine-1 des CSMs.

En ce sens, les CSPs des muscles vulnérables n'adoptent pas un phénotype favorisant les processus de réinnervation des JNMs. L'hyperactivation des récepteurs muscariniques pourrait empêcher l'établissement des changements morphologiques pour assurer les mécanismes de réinnervations tandis que dans les muscles résistants, cette activation adéquate des CSPs pourrait leur permettre de s'adapter efficacement. Il serait intéressant d'évaluer si les CSPs des muscles extraoculaires s'adaptent adéquatement au processus de régénération suite à une lésion des nerfs moteurs. Cependant, plusieurs obstacles techniques sont à prévoir : (1) effectuer d'une part une lésion précise du nerf oculomoteur qui est très difficile d'accès (2) déterminer avec précision la séquence temporelle de réinnervation ainsi que (3) caractériser les changements morphologiques des CSPs (ponts gliaux, marqueur de phagocytose gliale). Cependant, avec les avancées technologiques, il est désormais possible d'effectuer une lésion du nerf optique chez la souris (Agostinone, Alarcon-Martinez et al. 2018). Une adaptation de la procédure en cours pourrait potentiellement permettre d'effectuer une lésion similaire au niveau des motoneurones du noyau extraoculaires et évaluer la capacité des CSPs des JNMs des EOMs à adopter un phénotype favorisant la régénération axonale.

4.3.3.3 Modulation des CSPs – Défi à venir

L'un des plus grands défis dans les recherches publiées antérieurement et qui doivent être surmontés est l'évaluation précise de l'implication dans la SLA des CSPs grâce à une modulation spécifique de ces dernières. En effet, que ce passe-t-il si on inhibe l'expression spécifique de SOD1

muté uniquement dans les CSPs? Ceci va-t-il influencer le déclenchement de la SLA ou accélérer la progression? Certains auteurs ont inhibé l'expression de SOD1 via le système Cre-Lox dans les cellules de Schwann en utilisant le promoteur P0 qui est fortement exprimé dans les cellules de Schwann myélinisée et peu dans les cellules du Schwann périssynaptique (Lobsiger, Boillee et al. 2009). Ainsi, à ce jour, aucun promoteur spécifique des CSPs n'a été répertorié et il est donc impossible de les moduler directement.

Pour identifier un promoteur spécifique des CSPs, une étude récente publiée par le groupe de Valdez a développé un outil marquant spécifiquement les CSPs. En effet, une lignée transgénique a été générée dans laquelle les souris expriment le GFP sous le promoteur S100 β marquant ainsi toutes les différentes cellules de Schwann ainsi que le dsRED sous le promoteur NG2 marquant dans les cellules de Schwann périssynaptique ainsi que d'autres cellules gliales telles que les astrocytes, les oligodendrocytes et dans d'autres types cellulaires telles que les cellules endothéliales (Dimou and Gallo 2015). Avec cette combinaison, ils ont été en mesure d'isoler spécifiquement les CSPs par cytométrie en flux via un tri cellulaire basé sur l'activation de fluorescence (anglais : *fluorescence activated cell sorting*) ce qui a permis d'effectuer une analyse comparative du profil d'expression des ARNs (Castro, Taetzsch et al. 2020). Cette étude pionnière va permettre d'identifier des promoteurs spécifiques des CSPs qui pourront par la suite être utilisés pour inhiber spécifiquement l'expression de SOD1 via le système Cre-Lox ou bien pour moduler la signalisation des récepteurs muscariniques afin de valider leur contribution au déclenchement ainsi qu'à la progression de la dénervation des JNMs dans la SLA.

En résumé, dans les muscles vulnérables, l'hyperactivation muscarinique des CSPs dans la SLA semble être un phénomène biphasique qui est dans un premier temps stabilisateur pour les JNMs, mais qui, par son incapacité à adopter un profil pro-régénératif, nuit aux processus de réinnervation présents dans la SLA. Dans les muscles résistants, la signalisation muscarinique des CSPs n'est pas altérée et suggère donc qu'une signalisation adéquate des CSPs avant le développement de symptômes moteurs serait davantage appropriée. Ceci pourrait sous-entendre que les CSPs des JNMs des muscles extraoculaires décodent et s'adaptent adéquatement contrairement aux CSPs des JNMs vulnérables, ce qui pourrait expliquer cette remarquable résistance. Entre autres, une adaptation de quelques protéines synaptiques spécifiquement dans les EOMs du système des endocannabinoïdes ont pu être identifiées.

4.3.4 Le système des endocannabinoïdes

Le plus grand avantage des expériences de protéomique est la possibilité de mettre en lumière certaines cibles cellulaires possédant un potentiel thérapeutique qui n'avait pas fait office de recherches exhaustives antérieurement. Depuis quelques temps, la recherche au sujet du système des endocannabinoïdes connaît une effervescence dans le domaine des neurosciences. De nos jours, plusieurs vont s'intéresser à établir plus précisément le rôle des composés actifs du cannabis dans le développement du cerveau, dans le traitement des douleurs neuropathiques ainsi que dans plusieurs maladies neurodégénératives.

Dans le cadre de ce mémoire, les distinctions du protéome entre les préparations neuromusculaires résistantes et vulnérables ont permis de reporter une adaptation particulière du système des endocannabinoïdes dans les muscles extraoculaires au stade symptomatique : l'augmentation de l'enzyme NOS, importante pour les actions des endocannabinoïdes à la JNM (Newman, Malik et al. 2007) ainsi que la diminution des enzymes *MAGL* et *MGL* (Basavarajappa 2007) qui sont responsables de la dégradation des endocannabinoïdes y sont observées. Ceci permet d'explorer un environnement très prometteur : le système des endocannabinoïdes dans la SLA et leur action à la JNM.

4.3.4.1 Les endocannabinoïdes et leur implication dans la SLA

Dans la SLA, on observe une modulation de l'expression des endocannabinoïdes endogènes ainsi que des récepteurs. En effet, on observe une augmentation des endocannabinoïdes endogènes (anandamine et 2-AG) avant l'apparition des symptômes moteurs (Witting, Weydt et al. 2004) ainsi qu'une diminution des récepteurs CB₁ et une augmentation des récepteurs CB₂ dans les modèles animaux et chez les patients (Yiangou, Facer et al. 2006, Espejo-Porras, Piscitelli et al. 2015, Fernandez-Trapero, Espejo-Porras et al. 2017). L'utilisation d'agonistes non-spécifiques des récepteurs CB₁ et CB₂ a eu un effet remarquable : ceci a permis de retarder le déclenchement et de ralentir considérablement la progression de la maladie dans les modèles murins (Bilsland, Dick et al. 2006). Ainsi, les endocannabinoïdes seraient des candidats thérapeutiques prometteurs.

De manière intéressante, une différence d'expression protéique particulière des EOMs au stade symptomatique est reportée. Deux enzymes responsables de la dégradation des endocannabinoïdes endogènes (*MAGL* et *MGL*) (Basavarajappa 2007) sont diminuées dans les EOMs SOD1 comparativement aux WT. Ce changement du protéome est observé exclusivement

dans les muscles résistants pouvant ainsi suggérer qu'une augmentation du système des endocannabinoïde serait favorable au maintien des JNMs. Ceci concorde avec les recherches actuelles dans lesquelles l'utilisation de l'antagoniste KML29 de *MAGL* a retardé le déclenchement et ralenti la progression de la SLA (Pasquarelli, Engelskirchen et al. 2017). Ainsi, la dégradation des endocannabinoïde endogènes semble être diminuée dans les muscles résistants et pourrait être un facteur permettant le maintien des JNMs. Cependant, est-ce que les endocannabinoïdes ont un effet au niveau JNM ou pour le maintien de la fonction musculaire?

Les endocannabinoïdes ont des effets au niveau des cellules musculaire dans la SLA. En effet, l'utilisation de l'endocannabinoïde palmitoylethanolamide (PEA) a rétabli la fonction motrice au niveau des muscles du diaphragme. En effet, cet endocannabinoïde a diminué la désensibilisation des récepteurs nicotiniques musculaires et l'administration chez les patients a permis d'augmenter la fonction pulmonaire (Palma, Reyes-Ruiz et al. 2016) : l'une des principales causes de décès dans la SLA. Ainsi, les endocannabinoïdes semblent avoir un très grand potentiel thérapeutique dans la SLA et semblent interagir avec les récepteurs à la JNM. Quel serait leur mécanisme d'action à la JNM?

4.3.4.2 Les endocannabinoïdes et leur rôle à la JNM

Bien que les endocannabinoïdes soient peu étudiés, leur rôle à la JNM est intéressant puisqu'ils affectent des fonctions reliées aux CSPs et qui sont altérées dans la SLA. Entre autres, des changements synaptiques à la JNM sont observés suite à l'utilisation du composé actif des endocannabinoïde (Kumbaraci and Nastuk 1980, Turkanis and Karler 1986). Cependant, quels endocannabinoïdes endogènes sont responsables de ces effets synaptiques?

Dans un premier temps, les endocannabinoïdes peuvent modifier la transmission synaptique, un processus modulé par les CSPs. À la JNM d'amphibiens, l'endocannabinoïde endogène 2-arachidonoylglycerol (2-AG), module négativement et positivement la transmission synaptique de manière temporelle, et ce, via la contribution des différents éléments de la synapse tripartite. Dans un premier temps, l'activation des récepteurs CB₁ par le 2-AG mène à l'inhibition des canaux calciques voltage dépendant de type N se trouvant au niveau de la terminaison axonale (Sanchez-Pastor, Trujillo et al. 2007). Par la suite, une augmentation de la transmission synaptique est induite suite à la conversion du 2-AG en prostaglandine E₂ glycérol ester (PGE₂-G) via l'action de l'enzyme COX-2 qui est présente au niveau des prolongements des CSPs (Lindgren, Newman

et al. 2013). Ainsi, le système des endocannabinoïdes peut moduler la transmission synaptique à la JNM.

Ces changements synaptiques associées aux CSPs sont possibles grâce à la synthèse d'oxyde nitrique (Newman, Malik et al. 2007). La NO synthétase (NOS) est présente à la fois au niveau de la terminaison axonale, de la fibre musculaire ainsi que dans la CSP suggérant que la synthèse de l'oxyde nitrique pourrait être générée par plusieurs compartiments cellulaires (Newman, Malik et al. 2007). De manière intéressante, l'expression de NOS est supérieure dans les EOMs comparativement au EDL chez les WT ainsi qu'au stade symptomatique de la SLA. Ceci peut mener à l'hypothèse qu'il existe une plus grande contribution des mécanismes des NO dans les JNMs des EOMs. Malgré tout, plusieurs aspects au sujet du rôle des endocannabinoïde dans la SLA et dans la JNM demeurent à déterminer.

D'une part, la plasticité et la transmission synaptique sont régulées par les CSPs. La contribution de la signalisation des endocannabinoïdes à ces phénomènes sembleraient très plausibles. D'une part, les enzymes responsables de l'action des endocannabinoïdes telle le NOS ainsi que le COX-2 sont exprimées dans les CSPs (Newman, Malik et al. 2007, Lindgren, Newman et al. 2013). D'une autre part, dans le SNC, les cellules gliales telles les astrocytes et les microglies expriment les récepteurs CB₁ et/ou CB₂ (Ramirez, Blazquez et al. 2005, Navarrete and Araque 2008) et sont essentielles pour les mécanismes de plasticité synaptique à court terme et à long terme (Navarrete and Araque 2008). De plus, les différents changements synaptiques reportés par Lindgren et al (2013) à la JNM présentent un rôle différentiel des récepteurs muscariniques dans la modification temporelle de la transmission synaptique, des récepteurs exprimés entre autres par les CSPs (Lindgren, Newman et al. 2013). Ainsi sachant que les CSPs exécutent des fonctions similaires que ces cellules gliales à la JNM, il serait très vraisemblable qu'elles utilisent similairement le système des endocannabinoïdes pour moduler la transmission et la plasticité synaptique. Finalement, il serait intéressant de comparer la contribution du système des endocannabinoïdes entre les JNMs vulnérables et résistantes, de valider si l'adaptation de ce système dans les EOMs symptomatiques est possible due au décodage adéquat des CSPs de leur environnement synaptique et si ceci joue un rôle quelconque dans la résistance des EOMs au processus de dénervation.

4.4 Conclusion

En conclusion, il a été possible d'observer une atteinte différentielle des éléments synaptiques des JNMs des muscles extraoculaires comparativement aux muscles vulnérables dans la SLA. À un stade tardif de la maladie, la morphologie des JNMs des muscles extraoculaires est maintenue contrairement aux JNMs des muscles innervés par les motoneurones spinaux. Les CSPs des muscles extraoculaires ont une sensibilité aux différents agonistes non altérée suggérant un décodage synaptique adéquat à l'opposition des CSPs des muscles vulnérables. Finalement, l'analyse comparative du protéome a permis de mettre en lumière le maintien de certaines fonctions cellulaires (processus d'oxydoréduction, excitabilité neuronale, tamponnage calcique), une différence au niveau de l'expression de SOD1, une augmentation des neurofilaments ainsi qu'une modulation des enzymes responsables la signalisation des endocannabinoïdes qui pourraient, en somme, contribuer à la stabilisation et au maintien de la JNM des muscles extraoculaires.

Comprendre les mécanismes sous-jacents à cette résistance remarquable à la dénervation des JNMs des muscles extraoculaires est primordial. Grâce aux résultats de protéomique comparant le protéome des JNMs résistantes et vulnérables au processus de dénervation au stade symptomatique de la SLA, de futures cibles d'investigations ont pu être identifiées pour des études subséquentes. La confirmation de ces mécanismes spécifiques aux différents types cellulaires (muscle, motoneurone, CSPs) reste à être accomplie. Somme tout, investiguer les différences spécifiques des JNMs des muscles résistants tels les muscles extraoculaires aux JNMs des muscles vulnérables permettent d'ajouter une pièce à l'immense casse-tête représentant la pathophysiologie de la SLA. Au final, comprendre les mécanismes essentiels pour maintenir ou réparer adéquatement la JNM mènera potentiellement à l'élaboration de futures cibles thérapeutiques pouvant aider les patients souffrant de cette terrible maladie.

Références bibliographiques

- Adusumilli, R. and P. Mallick (2017). "Data Conversion with ProteoWizard msConvert." Methods Mol Biol **1550**: 339-368.
- Afifi, A. K., F. P. Aleu, J. Goodgold and B. MacKay (1966). "Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis." Neurology **16**(5): 475-481.
- Agostinone, J., L. Alarcon-Martinez, C. Gamlin, W. Q. Yu, R. O. L. Wong and A. Di Polo (2018). "Insulin signalling promotes dendrite and synapse regeneration and restores circuit function after axonal injury." Brain **141**(7): 1963-1980.
- Ahmadi, M., J.-X. Liu, T. Brännström, P. M. Andersen, P. Stål and F. Pedrosa-Domellöf (2010). "Human Extraocular Muscles in ALS." Investigative Ophthalmology & Visual Science **51**(7): 3494-3501.
- Ahuja, R., R. Pinyol, N. Reichenbach, L. Custer, J. Klingensmith, M. M. Kessels and B. Qualmann (2007). "Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology." Cell **131**(2): 337-350.
- Alami, N. H., R. B. Smith, M. A. Carrasco, L. A. Williams, C. S. Winborn, S. S. W. Han, E. Kiskinis, B. Winborn, B. D. Freibaum, A. Kanagaraj, A. J. Clare, N. M. Badders, B. Bilican, E. Chaum, S. Chandran, C. E. Shaw, K. C. Eggan, T. Maniatis and J. P. Taylor (2014). "Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations." Neuron **81**(3): 536-543.
- Alexianu, M. E., B. K. Ho, A. H. Mohamed, V. La Bella, R. G. Smith and S. H. Appel (1994). "The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis." Annals of neurology **36**(6): 846-858.
- Allen, N. J. and C. Eroglu (2017). "Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions." Neuron **96**(3): 697-708.
- Alles, S. R., E. Garcia, S. Balasubramanyan, K. Jones, J. R. Tyson, T. Joy, T. P. Snutch and P. A. Smith (2018). "Peripheral nerve injury increases contribution of L-type calcium channels to synaptic transmission in spinal lamina II: Role of alpha2delta-1 subunits." Mol Pain **14**: 1744806918765806.
- An, T., P. Shi, W. Duan, S. Zhang, P. Yuan, Z. Li, D. Wu, Z. Xu, C. Li and Y. Guo (2014). "Oxidative stress and autophagic alteration in brainstem of SOD1-G93A mouse model of ALS." Mol Neurobiol **49**(3): 1435-1448.
- Andersen, P. M., P. Nilsson, M. L. Keränen, L. Forsgren, J. Hägglund, M. Karlsborg, L. O. Ronnevi, O. Gredal and S. L. Marklund (1997). "Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia." Brain **120** (Pt 10): 1723-1737.
- Arai, T., M. Hasegawa, H. Akiyama, K. Ikeda, T. Nonaka, H. Mori, D. Mann, K. Tsuchiya, M. Yoshida, Y. Hashizume and T. Oda (2006). "TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." Biochemical and biophysical research communications **351**(3): 602-611.
- Araque, A., G. Carmignoto, P. G. Haydon, S. H. Oliet, R. Robitaille and A. Volterra (2014). "Gliotransmitters travel in time and space." Neuron **81**(4): 728-739.
- Araque, A., V. Parpura, R. P. Sanzgiri and P. G. Haydon (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner." Trends Neurosci **22**(5): 208-215.

- Arbour, D., E. Tremblay, E. Martineau, J. P. Julien and R. Robitaille (2015). "Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model." J Neurosci **35**(2): 688-706.
- Ash, P. E. A., K. F. Bieniek, T. F. Gendron, T. Caulfield, W.-L. Lin, M. DeJesus-Hernandez, M. M. van Blitterswijk, K. Jansen-West, J. W. Paul, 3rd, R. Rademakers, K. B. Boylan, D. W. Dickson and L. Petrucelli (2013). "Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS." Neuron **77**(4): 639-646.
- Auld, D. S. and R. Robitaille (2003). "Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation." Neuroscientist **9**(2): 144-157.
- Basavarajappa, B. S. (2007). "Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism." Protein Pept Lett **14**(3): 237-246.
- Beers, D. R., J. S. Henkel, Q. Xiao, W. Zhao, J. Wang, A. A. Yen, L. Siklos, S. R. McKercher and S. H. Appel (2006). "Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(43): 16021-16026.
- Belair, E. L., J. Vallee and R. Robitaille (2010). "In vivo long-term synaptic plasticity of glial cells." J Physiol **588**(Pt 7): 1039-1056.
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological) **57**(1): 289-300.
- Benoit, E. and D. Escande (1991). "Riluzole specifically blocks inactivated Na channels in myelinated nerve fibre." Pflugers Arch **419**(6): 603-609.
- Bensimon, G., L. Lacomblez and V. Meininger (1994). "A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group." N Engl J Med **330**(9): 585-591.
- Bergeron, C., K. Beric-Maskarel, S. Muntasser, L. Weyer, M. J. Somerville and M. E. Percy (1994). "Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons." J Neuropathol Exp Neurol **53**(3): 221-230.
- Bertone, N. I., A. I. Groisman, G. L. Mazzone, R. Cano, L. Tabares and O. D. Uchitel (2017). "Carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide shifts synaptic vesicle recycling to a fast mode at the mouse neuromuscular junction." Synapse **71**(12).
- Betz, W. J. (1970). "Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog." J Physiol **206**(3): 629-644.
- Bhandari, R., A. Kuhad and A. Kuhad (2018). "Edaravone: a new hope for deadly amyotrophic lateral sclerosis." Drugs Today (Barc) **54**(6): 349-360.
- Bilsland, L. G., J. R. Dick, G. Pryce, S. Petrosino, V. Di Marzo, D. Baker and L. Greensmith (2006). "Increasing cannabinoid levels by pharmacological and genetic manipulation delay disease progression in SOD1 mice." Faseb j **20**(7): 1003-1005.
- Boillée, S., C. Vande Velde and D. W. Cleveland (2006). "ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors." Neuron **52**(1): 39-59.
- Boillée, S., K. Yamanaka, C. S. Lobsiger, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, G. Kassiotis, G. Kollias and D. W. Cleveland (2006). "Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia." Science (New York, N.Y.) **312**(5778): 1389-1392.

- Boston-Howes, W., S. L. Gibb, E. O. Williams, P. Pasinelli, R. H. Brown, Jr. and D. Trotti (2006). "Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2." J Biol Chem **281**(20): 14076-14084.
- Bourque, M. J. and R. Robitaille (1998). "Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction." J Physiol **512** (Pt 1): 197-209.
- Brill, M. S., J. W. Lichtman, W. Thompson, Y. Zuo and T. Misgeld (2011). "Spatial constraints dictate glial territories at murine neuromuscular junctions." J Cell Biol **195**(2): 293-305.
- Brosius Lutz, A., W. S. Chung, S. A. Sloan, G. A. Carson, L. Zhou, E. Lovelett, S. Posada, J. B. Zuchero and B. A. Barres (2017). "Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(38): E8072-e8080.
- Brown, R. H. and A. Al-Chalabi (2017). "Amyotrophic Lateral Sclerosis." New England Journal of Medicine **377**(2): 162-172.
- Brujin, L. I., M. W. Becher, M. K. Lee, K. L. Anderson, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, S. S. Sisodia, J. D. Rothstein, D. R. Borchelt, D. L. Price and D. W. Cleveland (1997). "ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions." Neuron **18**(2): 327-338.
- Brujin, L. I., M. K. Houseweart, S. Kato, K. L. Anderson, S. D. Anderson, E. Ohama, A. G. Reaume, R. W. Scott and D. W. Cleveland (1998). "Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1." Science (New York, N.Y.) **281**(5384): 1851-1854.
- Buratti, E. and F. E. Baralle (2001). "Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9." The Journal of biological chemistry **276**(39): 36337-36343.
- Carpenter, S. (1968). "Proximal axonal enlargement in motor neuron disease." Neurology **18**(9): 841-851.
- Carrasco, D. I., B. A. Bahr, K. L. Seburn and M. J. Pinter (2016). "Abnormal response of distal Schwann cells to denervation in a mouse model of motor neuron disease." Exp Neurol **278**: 116-126.
- Carroll, S. L., M. L. Miller, P. W. Frohnert, S. S. Kim and J. A. Corbett (1997). "Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration." J Neurosci **17**(5): 1642-1659.
- Castonguay, A. and R. Robitaille (2001). "Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse." J Neurosci **21**(6): 1911-1922.
- Castro, R., T. Taetzsch, S. K. Vaughan, K. Godbe, J. Chappell, R. Settlege and G. Valdez (2020). "Identification of a molecular fingerprint for synaptic glia." bioRxiv: 2020.2003.2013.991323.
- Chambers, M. C., B. Maclean, R. Burke, D. Amodei, D. L. Ruderman, S. Neumann, L. Gatto, B. Fischer, B. Pratt, J. Egertson, K. Hoff, D. Kessner, N. Tasman, N. Shulman, B. Frewen, T. A. Baker, M. Y. Brusniak, C. Paulse, D. Creasy, L. Flashner, K. Kani, C. Moulding, S. L. Seymour, L. M. Nuwaysir, B. Lefebvre, F. Kuhlmann, J. Roark, P. Rainer, S. Detlev, T. Hemenway, A. Huhmer, J. Langridge, B. Connolly, T. Chadick, K. Holly, J. Eckels, E. W. Deutsch, R. L. Moritz, J. E. Katz, D. B. Agus, M. MacCoss, D. L. Tabb and P. Mallick (2012). "A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics." Nat Biotechnol **30**(10): 918-920.

- Chang, N. C., M. C. Sincennes, F. P. Chevalier, C. E. Brun, M. Lacaria, J. Segales, P. Munoz-Canoves, H. Ming and M. A. Rudnicki (2018). "The Dystrophin Glycoprotein Complex Regulates the Epigenetic Activation of Muscle Stem Cell Commitment." Cell Stem Cell **22**(5): 755-768.e756.
- Chard, P. S., D. Bleakman, S. Christakos, C. S. Fullmer and R. J. Miller (1993). "Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones." J Physiol **472**: 341-357.
- Chen, H. J., J. C. Mitchell, S. Novoselov, J. Miller, A. L. Nishimura, E. L. Scotter, C. A. Vance, M. E. Cheetham and C. E. Shaw (2016). "The heat shock response plays an important role in TDP-43 clearance: evidence for dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis." Brain **139**(Pt 5): 1417-1432.
- Chou, C. C., Y. Zhang, M. E. Umoh, S. W. Vaughan, I. Lorenzini, F. Liu, M. Sayegh, P. G. Donlin-Asp, Y. H. Chen, D. M. Duong, N. T. Seyfried, M. A. Powers, T. Kukar, C. M. Hales, M. Gearing, N. J. Cairns, K. B. Boylan, D. W. Dickson, R. Rademakers, Y. J. Zhang, L. Petrucelli, R. Sattler, D. C. Zarnescu, J. D. Glass and W. Rossoll (2018). "TDP-43 pathology disrupts nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic transport in ALS/FTD." Nat Neurosci **21**(2): 228-239.
- Chou, S. M., H. S. Wang, A. Taniguchi and R. Bucala (1998). "Advanced glycation endproducts in neurofilament conglomeration of motoneurons in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis." Mol Med **4**(5): 324-332.
- Chung, W. S. and B. A. Barres (2009). "Selective remodeling: refining neural connectivity at the neuromuscular junction." PLoS Biol **7**(8): e1000185.
- Cohen, J. L., K. R. Weiss and I. Kupfermann (1978). "Motor control of buccal muscles in Aplysia." Journal of Neurophysiology **41**(1): 157-180.
- Comley, L., I. Allodi, S. Nichterwitz, M. Nizzardo, C. Simone, S. Corti and E. Hedlund (2015). "Motor neurons with differential vulnerability to degeneration show distinct protein signatures in health and ALS." Neuroscience **291**: 216-229.
- Comley, L. H., J. Nijssen, J. Frost-Nylen and E. Hedlund (2016). "Cross-disease comparison of amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy reveals conservation of selective vulnerability but differential neuromuscular junction pathology." J Comp Neurol **524**(7): 1424-1442.
- Cooper-Knock, J., A. Higginbottom, M. J. Stopford, J. R. Highley, P. G. Ince, S. B. Wharton, S. Pickering-Brown, J. Kirby, G. M. Hautbergue and P. J. Shaw (2015). "Antisense RNA foci in the motor neurons of C9ORF72-ALS patients are associated with TDP-43 proteinopathy." Acta neuropathologica **130**(1): 63-75.
- Corcia, P., C. Tauber, J. Vercoullie, N. Arlicot, C. Prunier, J. Praline, G. Nicolas, Y. Venel, C. Hommet, J.-L. Baulieu, J.-P. Cottier, C. Roussel, M. Kassiou, D. Guilloteau and M.-J. Ribeiro (2012). "Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis." PloS one **7**(12): e52941-e52941.
- Cote, F., J. F. Collard and J. P. Julien (1993). "Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." Cell **73**(1): 35-46.
- Crapo, J. D., T. Oury, C. Rabouille, J. W. Slot and L. Y. Chang (1992). "Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(21): 10405-10409.

- Cruz, M. P. (2018). "Edaravone (Radicava): A Novel Neuroprotective Agent for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *P t* **43**(1): 25-28.
- Dale, H. H., W. Feldberg and M. Vogt (1936). "Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings." *J Physiol* **86**(4): 353-380.
- Damiano, M., A. A. Starkov, S. Petri, K. Kipiani, M. Kiaei, M. Mattiazzi, M. Flint Beal and G. Manfredi (2006). "Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice." *Journal of neurochemistry* **96**(5): 1349-1361.
- Darabid, H., D. Arbour and R. Robitaille (2013). "Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction." *J Neurosci* **33**(4): 1297-1313.
- Darabid, H., A. St-Pierre-See and R. Robitaille (2018). "Purinergic-Dependent Glial Regulation of Synaptic Plasticity of Competing Terminals and Synapse Elimination at the Neuromuscular Junction." *Cell Rep* **25**(8): 2070-2082.e2076.
- Davidson, Y. S., H. Barker, A. C. Robinson, J. C. Thompson, J. Harris, C. Troakes, B. Smith, S. Al-Saraj, C. Shaw, S. Rollinson, M. Masuda-Suzukake, M. Hasegawa, S. Pickering-Brown, J. S. Snowden and D. M. Mann (2014). "Brain distribution of dipeptide repeat proteins in frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72." *Acta neuropathologica communications* **2**: 70-70.
- De Winter, F., T. Vo, F. J. Stam, L. A. Wisman, P. R. Bar, S. P. Niclou, F. L. van Muiswinkel and J. Verhaagen (2006). "The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease." *Mol Cell Neurosci* **32**(1-2): 102-117.
- DeChiara, T. M., D. C. Bowen, D. M. Valenzuela, M. V. Simmons, W. T. Poueymirou, S. Thomas, E. Kinetz, D. L. Compton, E. Rojas, J. S. Park, C. Smith, P. S. DiStefano, D. J. Glass, S. J. Burden and G. D. Yancopoulos (1996). "The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo." *Cell* **85**(4): 501-512.
- DeJesus-Hernandez, M., N. A. Finch, X. Wang, T. F. Gendron, K. F. Bieniek, M. G. Heckman, A. Vasilevich, M. E. Murray, L. Rousseau, R. Weesner, A. Lucido, M. Parsons, J. Chew, K. A. Josephs, J. E. Parisi, D. S. Knopman, R. C. Petersen, B. F. Boeve, N. R. Graff-Radford, J. de Boer, Y. W. Asmann, L. Petrucelli, K. B. Boylan, D. W. Dickson, M. van Blitterswijk and R. Rademakers (2017). "In-depth clinico-pathological examination of RNA foci in a large cohort of C9ORF72 expansion carriers." *Acta neuropathologica* **134**(2): 255-269.
- DeJesus-Hernandez, M., I. R. Mackenzie, B. F. Boeve, A. L. Boxer, M. Baker, N. J. Rutherford, A. M. Nicholson, N. A. Finch, H. Flynn, J. Adamson, N. Kouri, A. Wojtas, P. Sengdy, G.-Y. R. Hsiung, A. Karydas, W. W. Seeley, K. A. Josephs, G. Coppola, D. H. Geschwind, Z. K. Wszolek, H. Feldman, D. S. Knopman, R. C. Petersen, B. L. Miller, D. W. Dickson, K. B. Boylan, N. R. Graff-Radford and R. Rademakers (2011). "Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS." *Neuron* **72**(2): 245-256.
- Descarries, L. M., S. Cai, R. Robitaille, E. M. Josephson and D. K. Morest (1998). "Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction." *J Neurocytol* **27**(11): 829-840.
- Deutsch, E. W., L. Mendoza, D. Shteynberg, J. Slagel, Z. Sun and R. L. Moritz (2015). "Trans-Proteomic Pipeline, a standardized data processing pipeline for large-scale reproducible proteomics informatics." *Proteomics Clin Appl* **9**(7-8): 745-754.

- Dimou, L. and V. Gallo (2015). "NG2-glia and their functions in the central nervous system." Glia **63**(8): 1429-1451.
- Ditsworth, D., M. Maldonado, M. McAlonis-Downes, S. Sun, A. Seelman, K. Drenner, E. Arnold, S. C. Ling, D. Pizzo, J. Ravits, D. W. Cleveland and S. Da Cruz (2017). "Mutant TDP-43 within motor neurons drives disease onset but not progression in amyotrophic lateral sclerosis." Acta Neuropathol **133**(6): 907-922.
- Dobrowolny, G., M. Aucello, E. Rizzuto, S. Beccafico, C. Mammucari, S. Boncompagni, S. Belia, F. Wannenes, C. Nicoletti, Z. Del Prete, N. Rosenthal, M. Molinaro, F. Protasi, G. Fanò, M. Sandri and A. Musarò (2008). "Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity." Cell metabolism **8**(5): 425-436.
- Donaghy, C., M. J. Thurtell, E. P. Pioro, J. M. Gibson and R. J. Leigh (2011). "Eye movements in amyotrophic lateral sclerosis and its mimics: a review with illustrative cases." J Neurol Neurosurg Psychiatry **82**(1): 110-116.
- Dunkle, E. T., F. Zaucke and D. O. Clegg (2007). "Thrombospondin-4 and matrix three-dimensionality in axon outgrowth and adhesion in the developing retina." Exp Eye Res **84**(4): 707-717.
- Dupuis, L., J. L. Gonzalez de Aguilar, A. Echaniz-Laguna, J. Eschbach, F. Rene, H. Oudart, B. Halter, C. Huze, L. Schaeffer, F. Bouillaud and J. P. Loeffler (2009). "Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons." PLoS One **4**(4): e5390.
- Duregotti, E., S. Negro, M. Scorzeto, I. Zorretta, B. C. Dickinson, C. J. Chang, C. Montecucco and M. Rigoni (2015). "Mitochondrial alarmins released by degenerating motor axon terminals activate perisynaptic Schwann cells." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(5): E497-505.
- Eden, E., R. Navon, I. Steinfeld, D. Lipson and Z. Yakhini (2009). "GORilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists." BMC Bioinformatics **10**(1): 48.
- Edens, B. M., J. Yan, N. Miller, H. X. Deng, T. Siddique and Y. C. Ma (2017). "A novel ALS-associated variant in UBQLN4 regulates motor axon morphogenesis." Elife **6**.
- Eisen, A., H. Braak, K. Del Tredici, R. Lemon, A. C. Ludolph and M. C. Kiernan (2017). "Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **88**(11): 917-924.
- Eng, J. K., T. A. Jahan and M. R. Hoopmann (2013). "Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool." Proteomics **13**(1): 22-24.
- Espejo-Porras, F., F. Piscitelli, R. Verde, J. A. Ramos, V. Di Marzo, E. de Lago and J. Fernandez-Ruiz (2015). "Changes in the endocannabinoid signaling system in CNS structures of TDP-43 transgenic mice: relevance for a neuroprotective therapy in TDP-43-related disorders." J Neuroimmune Pharmacol **10**(2): 233-244.
- Fallini, C., G. J. Bassell and W. Rossoll (2012). "The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth." Hum Mol Genet **21**(16): 3703-3718.
- Feng, Z. and C.-P. Ko (2008). "Schwann Cells Promote Synaptogenesis at the Neuromuscular Junction via Transforming Growth Factor- β 1." The Journal of Neuroscience **28**(39): 9599-9609.
- Fernandez-Trapero, M., F. Espejo-Porras, C. Rodriguez-Cueto, J. R. Coates, C. Perez-Diaz, E. de Lago and J. Fernandez-Ruiz (2017). "Upregulation of CB2 receptors in reactive astrocytes

- in canine degenerative myelopathy, a disease model of amyotrophic lateral sclerosis." Dis Model Mech **10**(5): 551-558.
- Ferraiuolo, L., A. Higginbottom, P. R. Heath, S. Barber, D. Greenald, J. Kirby and P. J. Shaw (2011). "Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis." Brain : a journal of neurology **134**(Pt 9): 2627-2641.
- Field, L. S., Y. Furukawa, T. V. O'Halloran and V. C. Culotta (2003). "Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria." The Journal of biological chemistry **278**(30): 28052-28059.
- Fischer, L. R., D. G. Culver, P. Tennant, A. A. Davis, M. Wang, A. Castellano-Sanchez, J. Khan, M. A. Polak and J. D. Glass (2004). "Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man." Experimental neurology **185**(2): 232-240.
- Flucher, B. E. and M. Campiglio (2019). "STAC proteins: The missing link in skeletal muscle EC coupling and new regulators of calcium channel function." Biochim Biophys Acta Mol Cell Res **1866**(7): 1101-1110.
- Frakes, A. E., L. Ferraiuolo, A. M. Haidet-Phillips, L. Schmelzer, L. Braun, C. J. Miranda, K. J. Ladner, A. K. Bevan, K. D. Foust, J. P. Godbout, P. G. Popovich, D. C. Guttridge and B. K. Kaspar (2014). "Microglia induce motor neuron death via the classical NF-kappaB pathway in amyotrophic lateral sclerosis." Neuron **81**(5): 1009-1023.
- Frakes, A. E., L. Ferraiuolo, A. M. Haidet-Phillips, L. Schmelzer, L. Braun, C. J. Miranda, K. J. Ladner, A. K. Bevan, K. D. Foust, J. P. Godbout, P. G. Popovich, D. C. Guttridge and B. K. Kaspar (2014). "Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis." Neuron **81**(5): 1009-1023.
- Frey, D., C. Schneider, L. Xu, J. Borg, W. Spooren and P. Caroni (2000). "Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases." J Neurosci **20**(7): 2534-2542.
- Gautam, M., P. G. Noakes, J. Mudd, M. Nichol, G. C. Chu, J. R. Sanes and J. P. Merlie (1995). "Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice." Nature **377**(6546): 232-236.
- Georgiou, J. and M. P. Charlton (1999). "Non-myelin-forming perisynaptic schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein." Glia **27**(2): 101-109.
- Georgiou, J., R. Robitaille and M. P. Charlton (1999). "Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia." J Neurosci **19**(10): 3836-3846.
- Georgiou, J., R. Robitaille, W. S. Trimble and M. P. Charlton (1994). "Synaptic regulation of glial protein expression in vivo." Neuron **12**(2): 443-455.
- Gordon, T., J. Hegedus and S. L. Tam (2004). "Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease." Neurol Res **26**(2): 174-185.
- Gould, T. W., R. R. Buss, S. Vinsant, D. Prevette, W. Sun, C. M. Knudson, C. E. Milligan and R. W. Oppenheim (2006). "Complete Dissociation of Motor Neuron Death from Motor Dysfunction by Bax Deletion in a Mouse Model of ALS." The Journal of Neuroscience **26**(34): 8774-8786.
- Gowing, G., T. Philips, B. Van Wijmeersch, J.-N. Audet, M. Dewil, L. Van Den Bosch, A. D. Billiau, W. Robberecht and J.-P. Julien (2008). "Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **28**(41): 10234-10244.

- Gravel, M., L. C. Beland, G. Soucy, E. Abdelhamid, R. Rahimian, C. Gravel and J. Kriz (2016). "IL-10 Controls Early Microglial Phenotypes and Disease Onset in ALS Caused by Misfolded Superoxide Dismutase 1." J Neurosci **36**(3): 1031-1048.
- Gurney, M. E., H. Pu, A. Y. Chiu, M. C. Dal Canto, C. Y. Polchow, D. D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y. W. Kwon and H. X. Deng (1994). "Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation." Science (New York, N.Y.) **264**(5166): 1772-1775.
- Haidet-Phillips, A. M., M. E. Hester, C. J. Miranda, K. Meyer, L. Braun, A. Frakes, S. Song, S. Likhite, M. J. Murtha, K. D. Foust, M. Rao, A. Eagle, A. Kammesheidt, A. Christensen, J. R. Mendell, A. H. Burghes and B. K. Kaspar (2011). "Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons." Nat Biotechnol **29**(9): 824-828.
- Hannan, M. A., M. Mohibbullah, Y. K. Hong and I. S. Moon (2017). "Proteomic Analysis of the Neurotrophic Effect of Gelidium amansii in Primary Cultured Neurons." J Med Food **20**(3): 279-287.
- Harraz, M. M., J. J. Marden, W. Zhou, Y. Zhang, A. Williams, V. S. Sharov, K. Nelson, M. Luo, H. Paulson, C. Schöneich and J. F. Engelhardt (2008). "SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model." The Journal of clinical investigation **118**(2): 659-670.
- Hayworth, C. R., S. E. Moody, L. A. Chodosh, P. Krieg, M. Rimer and W. J. Thompson (2006). "Induction of neuregulin signaling in mouse schwann cells in vivo mimics responses to denervation." J Neurosci **26**(25): 6873-6884.
- Heberle, H., G. V. Meirelles, F. R. da Silva, G. P. Telles and R. Minghim (2015). "InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams." BMC Bioinformatics **16**(1): 169.
- Hedlund, E., M. Karlsson, T. Osborn, W. Ludwig and O. Isacson (2010). "Global gene expression profiling of somatic motor neuron populations with different vulnerability identify molecules and pathways of degeneration and protection." Brain **133**(Pt 8): 2313-2330.
- Hegedus, J., C. T. Putman and T. Gordon (2007). "Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." Neurobiol Dis **28**(2): 154-164.
- Hegedus, J., C. T. Putman, N. Tyreman and T. Gordon (2008). "Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." J Physiol **586**(14): 3337-3351.
- Henderson, C. E., H. S. Phillips, R. A. Pollock, A. M. Davies, C. Lemeulle, M. Armanini, L. Simmons, B. Moffet, R. A. Vandlen, L. C. c. t. S. L. Simpson, V. E. Koliatsos, A. Rosenthal and et al. (1994). "GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle." Science **266**(5187): 1062-1064.
- Henkel, J. S., D. R. Beers, L. Siklós and S. H. Appel (2006). "The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS." Molecular and cellular neurosciences **31**(3): 427-437.
- Henkel, J. S., J. I. Engelhardt, L. Siklós, E. P. Simpson, S. H. Kim, T. Pan, J. C. Goodman, T. Siddique, D. R. Beers and S. H. Appel (2004). "Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue." Annals of neurology **55**(2): 221-235.

- Higgins, C. M. J., C. Jung and Z. Xu (2003). "ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes." BMC neuroscience **4**: 16-16.
- Hirano, A., H. Donnenfeld, S. Sasaki and I. Nakano (1984). "Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis." Journal of neuropathology and experimental neurology **43**(5): 461-470.
- Howland, D. S., J. Liu, Y. She, B. Goad, N. J. Maragakis, B. Kim, J. Erickson, J. Kulik, L. DeVito, G. Psaltis, L. J. DeGennaro, D. W. Cleveland and J. D. Rothstein (2002). "Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS)." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1604-1609.
- Huang, H., Y. Zhao, X. Shang, X. Liu and H. Ren (2017). "Expression of carbonic anhydrase III and skeletal muscle remodeling following selective denervation." Mol Med Rep **16**(6): 8289-8294.
- Huber, A. B., A. Kania, T. S. Tran, C. Gu, N. De Marco Garcia, I. Lieberam, D. Johnson, T. M. Jessell, D. D. Ginty and A. L. Kolodkin (2005). "Distinct roles for secreted semaphorin signaling in spinal motor axon guidance." Neuron **48**(6): 949-964.
- Jacobson, C., P. D. Cote, S. G. Rossi, R. L. Rotundo and S. Carbonetto (2001). "The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane." J Cell Biol **152**(3): 435-450.
- Jahromi, B. S., R. Robitaille and M. P. Charlton (1992). "Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ." Neuron **8**(6): 1069-1077.
- Jarvis, S. E., W. Barr, Z. P. Feng, J. Hamid and G. W. Zamponi (2002). "Molecular determinants of syntaxin 1 modulation of N-type calcium channels." J Biol Chem **277**(46): 44399-44407.
- Je, H. S., F. Yang, Y. Ji, S. Potluri, X. Q. Fu, Z. G. Luo, G. Nagappan, J. P. Chan, B. Hempstead, Y. J. Son and B. Lu (2013). "ProBDNF and mature BDNF as punishment and reward signals for synapse elimination at mouse neuromuscular junctions." J Neurosci **33**(24): 9957-9962.
- Jiang, J. and J. Ravits (2019). "Pathogenic Mechanisms and Therapy Development for C9orf72 Amyotrophic Lateral Sclerosis/Frontotemporal Dementia." Neurotherapeutics.
- Johnson, J. O., J. Mandrioli, M. Benatar, Y. Abramzon, V. M. Van Deerlin, J. Q. Trojanowski, J. R. Gibbs, M. Brunetti, S. Gronka, J. Wu, J. Ding, L. McCluskey, M. Martinez-Lage, D. Falcone, D. G. Hernandez, S. Arepalli, S. Chong, J. C. Schymick, J. Rothstein, F. Landi, Y.-D. Wang, A. Calvo, G. Mora, M. Sabatelli, M. R. Monsurro, S. Battistini, F. Salvi, R. Spataro, P. Sola, G. Borghero, G. Galassi, S. W. Scholz, J. P. Taylor, G. Restagno, A. Chiò and B. J. Traynor (2010). "Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS." Neuron **68**(5): 857-864.
- Julien, J. P., F. Cote and J. F. Collard (1995). "Mice overexpressing the human neurofilament heavy gene as a model of ALS." Neurobiol Aging **16**(3): 487-490; discussion 490-482.
- Julien, J. P. and W. E. Mushynski (1998). "Neurofilaments in health and disease." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **61**: 1-23.
- Kalmar, B., S. Novoselov, A. Gray, M. E. Cheetham, B. Margulis and L. Greensmith (2008). "Late stage treatment with arimoclomol delays disease progression and prevents protein aggregation in the SOD1 mouse model of ALS." J Neurochem **107**(2): 339-350.
- Kang, H. and J. W. Lichtman (2013). "Motor Axon Regeneration and Muscle Reinnervation in Young Adult and Aged Animals." The Journal of Neuroscience **33**(50): 19480-19491.

- Kang, H., L. Tian and W. Thompson (2003). "Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury." J Neurocytol **32**(5-8): 975-985.
- Kang, L., X. Liu, Z. Gong, H. Zheng, J. Wang, Y. Li, H. Yang, J. Hardwick, H. Dai, R. T. P. Poon, N. P. Lee, M. Mao, Z. Peng and R. Chen (2015). "Genome-wide identification of RNA editing in hepatocellular carcinoma." Genomics **105**(2): 76-82.
- Kang, S. H., M. Fukaya, J. K. Yang, J. D. Rothstein and D. E. Bergles (2010). "NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration." Neuron **68**(4): 668-681.
- Kang, S. H., Y. Li, M. Fukaya, I. Lorenzini, D. W. Cleveland, L. W. Ostrow, J. D. Rothstein and D. E. Bergles (2013). "Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis." Nature neuroscience **16**(5): 571-579.
- Kaplan, A., K. J. Spiller, C. Towne, K. C. Kanning, G. T. Choe, A. Geber, T. Akay, P. Aebischer and C. E. Henderson (2014). "Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration." Neuron **81**(2): 333-348.
- Kawamata, T., H. Akiyama, T. Yamada and P. L. McGeer (1992). "Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue." The American journal of pathology **140**(3): 691-707.
- Kawamura, Y., P. J. Dyck, M. Shimono, H. Okazaki, J. Tateishi and H. Doi (1981). "Morphometric comparison of the vulnerability of peripheral motor and sensory neurons in amyotrophic lateral sclerosis." Journal of neuropathology and experimental neurology **40**(6): 667-675.
- Keller, A., A. I. Nesvizhskii, E. Kolker and R. Aebersold (2002). "Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search." Anal Chem **74**(20): 5383-5392.
- Kikuchi, H., G. Almer, S. Yamashita, C. Guégan, M. Nagai, Z. Xu, A. A. Sosunov, G. M. McKhann, 2nd and S. Przedborski (2006). "Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(15): 6025-6030.
- Kim, O. J., M. A. Ariano, R. A. Lazzarini, M. S. Levine and D. R. Sibley (2002). "Neurofilament-M interacts with the D1 dopamine receptor to regulate cell surface expression and desensitization." J Neurosci **22**(14): 5920-5930.
- Kohr, G. and I. Mody (1991). "Endogenous intracellular calcium buffering and the activation/inactivation of HVA calcium currents in rat dentate gyrus granule cells." J Gen Physiol **98**(5): 941-967.
- Kong, J., V. W. Tung, J. Aghajanian and Z. Xu (1998). "Antagonistic roles of neurofilament subunits NF-H and NF-M against NF-L in shaping dendritic arborization in spinal motor neurons." J Cell Biol **140**(5): 1167-1176.
- Kong, J. and Z. Xu (1998). "Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **18**(9): 3241-3250.
- Kovanda, A., M. Zalar, P. Šket, J. Plavec and B. Rogelj (2015). "Anti-sense DNA d(GGCCCC)n expansions in C9ORF72 form i-motifs and protonated hairpins." Scientific reports **5**: 17944-17944.
- Kumbaraci, N. M. and W. L. Nastuk (1980). "Effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on excitable membranes and neuromuscular transmission." Mol Pharmacol **17**(3): 344-349.

- Kuo, P.-H., C.-H. Chiang, Y.-T. Wang, L. G. Doudeva and H. S. Yuan (2014). "The crystal structure of TDP-43 RRM1-DNA complex reveals the specific recognition for UG- and TG-rich nucleic acids." Nucleic acids research **42**(7): 4712-4722.
- Lagier-Tourenne, C., M. Polymenidou and D. W. Cleveland (2010). "TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration." Hum Mol Genet **19**(R1): R46-64.
- Lang, F., S. Aravamudhan, H. Nolte, C. Turk, S. Holper, S. Muller, S. Gunther, B. Blaauw, T. Braun and M. Kruger (2017). "Dynamic changes in the mouse skeletal muscle proteome during denervation-induced atrophy." Dis Model Mech **10**(7): 881-896.
- Laslo, P., J. Lipski, L. F. Nicholson, G. B. Miles and G. D. Funk (2001). "GluR2 AMPA receptor subunit expression in motoneurons at low and high risk for degeneration in amyotrophic lateral sclerosis." Experimental neurology **169**(2): 461-471.
- Lee, Y., B. M. Morrison, Y. Li, S. Lengacher, M. H. Farah, P. N. Hoffman, Y. Liu, A. Tsingalia, L. Jin, P.-W. Zhang, L. Pellerin, P. J. Magistretti and J. D. Rothstein (2012). "Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration." Nature **487**(7408): 443-448.
- Lenglet, T. and J. P. Camdessanche (2017). "Amyotrophic lateral sclerosis or not: Keys for the diagnosis." Rev Neurol (Paris) **173**(5): 280-287.
- Liddelow, S. A., K. A. Guttenplan, L. E. Clarke, F. C. Bennett, C. J. Bohlen, L. Schirmer, M. L. Bennett, A. E. Munch, W. S. Chung, T. C. Peterson, D. K. Wilton, A. Frouin, B. A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M. S. Buckwalter, D. H. Rowitch, V. L. Dawson, T. M. Dawson, B. Stevens and B. A. Barres (2017). "Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia." Nature **541**(7638): 481-487.
- Lindgren, C. A., Z. L. Newman, J. J. Morford, S. B. Ryan, K. A. Battani and Z. Su (2013). "Cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 glycerol ester and nitric oxide are involved in muscarine-induced presynaptic enhancement at the vertebrate neuromuscular junction." J Physiol **591**(19): 4749-4764.
- Ling, S.-C., M. Polymenidou and D. W. Cleveland (2013). "Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis." Neuron **79**(3): 416-438.
- Ling, S. C., M. Polymenidou and D. W. Cleveland (2013). "Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis." Neuron **79**(3): 416-438.
- Liu, J., C. Lillo, P. A. Jonsson, C. Vande Velde, C. M. Ward, T. M. Miller, J. R. Subramaniam, J. D. Rothstein, S. Marklund, P. M. Andersen, T. Brännström, O. Gredal, P. C. Wong, D. S. Williams and D. W. Cleveland (2004). "Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria." Neuron **43**(1): 5-17.
- Liu, J., L. A. Shinobu, C. M. Ward, D. Young and D. W. Cleveland (2005). "Elevation of the Hsp70 chaperone does not effect toxicity in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis." Journal of neurochemistry **93**(4): 875-882.
- Liu, J.-X., T. Brännström, P. M. Andersen and F. Pedrosa-Domellöf (2011). "Different Impact of ALS on Laminin Isoforms in Human Extraocular Muscles versus Limb Muscles." Investigative Ophthalmology & Visual Science **52**(7): 4842-4852.
- Lobsiger, C. S., S. Boillee, M. McAlonis-Downes, A. M. Khan, M. L. Feltri, K. Yamanaka and D. W. Cleveland (2009). "Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(11): 4465-4470.

- Love, F. M., Y. J. Son and W. J. Thompson (2003). "Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of Schwann cell pathways that grow to link synaptic sites." J Neurobiol **54**(4): 566-576.
- Love, F. M. and W. J. Thompson (1998). "Schwann Cells Proliferate at Rat Neuromuscular Junctions during Development and Regeneration." The Journal of Neuroscience **18**(22): 9376-9385.
- Love, F. M. and W. J. Thompson (1999). "Glial Cells Promote Muscle Reinnervation by Responding to Activity-Dependent Postsynaptic Signals." The Journal of Neuroscience **19**(23): 10390-10396.
- Lubischer, J. L. and D. M. Bebinger (1999). "Regulation of terminal Schwann cell number at the adult neuromuscular junction." J Neurosci **19**(24): Rc46.
- Machamer, J. B., S. E. Collins and T. E. Lloyd (2014). "The ALS gene FUS regulates synaptic transmission at the Drosophila neuromuscular junction." Human Molecular Genetics **23**(14): 3810-3822.
- Mackenzie, I. R. A., P. Frick, F. A. Grässer, T. F. Gendron, L. Petrucelli, N. R. Cashman, D. Edbauer, E. Kremmer, J. Prudlo, D. Troost and M. Neumann (2015). "Quantitative analysis and clinico-pathological correlations of different dipeptide repeat protein pathologies in C9ORF72 mutation carriers." Acta neuropathologica **130**(6): 845-861.
- Magill, C. K., A. Tong, D. Kawamura, A. Hayashi, D. A. Hunter, A. Parsadanian, S. E. Mackinnon and T. M. Myckatyn (2007). "Reinnervation of the tibialis anterior following sciatic nerve crush injury: a confocal microscopic study in transgenic mice." Exp Neurol **207**(1): 64-74.
- Maharjan, N., C. Künzli, K. Buthey and S. Saxena (2017). "C9ORF72 Regulates Stress Granule Formation and Its Deficiency Impairs Stress Granule Assembly, Hypersensitizing Cells to Stress." Molecular neurobiology **54**(4): 3062-3077.
- Malgouris, C., M. Daniel and A. Doble (1994). "Neuroprotective effects of riluzole on N-methyl-D-aspartate- or veratridine-induced neurotoxicity in rat hippocampal slices." Neurosci Lett **177**(1-2): 95-99.
- Mallart, A. and A. R. Martin (1968). "The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog." J Physiol **196**(3): 593-604.
- Manzo, E., I. Lorenzini, D. Barrameda, A. G. O'Conner, J. M. Barrows, A. Starr, T. Kovalik, B. E. Rabichow, E. M. Lehmkuhl, D. D. Shreiner, A. Joardar, J. C. Liévens, R. Bowser, R. Sattler and D. C. Zarnescu (2019). "Glycolysis upregulation is neuroprotective as a compensatory mechanism in ALS." Elife **8**.
- Marques, M. J., E. C. Pereira, E. Minatel and H. S. Neto (2006). "Nerve-terminal and Schwann-cell response after nerve injury in the absence of nitric oxide." Muscle Nerve **34**(2): 225-231.
- Marszalek, J. R., T. L. Williamson, M. K. Lee, Z. Xu, P. N. Hoffman, M. W. Becher, T. O. Crawford and D. W. Cleveland (1996). "Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport." J Cell Biol **135**(3): 711-724.
- Martineau, E., D. Arbour, J. Vallee and R. Robitaille (in prep). "Properties of Glial Cell at the Neuromuscular Junction are Incompatible with synaptic repair in the SOD1G37R ALS mouse model."
- Martineau, E., A. Di Polo, C. Vande Velde and R. Robitaille (2018). "Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS." Elife **7**.
- Martineau, É., A. Di Polo, C. Vande Velde and R. Robitaille (2020). "Sex-Specific Differences in Motor-Unit Remodeling in a Mouse Model of ALS." eNeuro **7**(1).

- Maruyama, H., H. Morino, H. Ito, Y. Izumi, H. Kato, Y. Watanabe, Y. Kinoshita, M. Kamada, H. Nodera, H. Suzuki, O. Komure, S. Matsuura, K. Kobatake, N. Morimoto, K. Abe, N. Suzuki, M. Aoki, A. Kawata, T. Hirai, T. Kato, K. Ogasawara, A. Hirano, T. Takumi, H. Kusaka, K. Hagiwara, R. Kaji and H. Kawakami (2010). "Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis." Nature **465**(7295): 223-226.
- Masuda, K., T. Furuyama, M. Takahara, S. Fujioka, H. Kurinami and S. Inagaki (2004). "Sema4D stimulates axonal outgrowth of embryonic DRG sensory neurones." Genes Cells **9**(9): 821-829.
- Matteoli, M., C. Haimann and P. De Camilli (1990). "Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction." Neuroscience **37**(1): 271-275.
- Matteoli, M., C. Haimann, F. Torri-Tarelli, J. M. Polak, B. Ceccarelli and P. De Camilli (1988). "Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7366-7370.
- Mattiazzi, M., M. D'Aurelio, C. D. Gajewski, K. Martushova, M. Kiaei, M. F. Beal and G. Manfredi (2002). "Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice." The Journal of biological chemistry **277**(33): 29626-29633.
- McLoon, L. K., V. M. Harandi, T. Brannstrom, P. M. Andersen and J. X. Liu (2014). "Wnt and extraocular muscle sparing in amyotrophic lateral sclerosis." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(9): 5482-5496.
- Mejzini, R., L. L. Flynn, I. L. Pitout, S. Fletcher, S. D. Wilton and P. A. Akkari (2019). "ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now?" Frontiers in Neuroscience **13**(1310).
- Menon, P., M. C. Kiernan and S. Vucic (2015). "Cortical hyperexcitability precedes lower motor neuron dysfunction in ALS." Clin Neurophysiol **126**(4): 803-809.
- Mesci, P., S. Zaidi, C. S. Lobsiger, S. Millicamps, C. Escartin, D. Seilhean, H. Sato, M. Mallat and S. Boillee (2015). "System xC⁻ is a mediator of microglial function and its deletion slows symptoms in amyotrophic lateral sclerosis mice." Brain **138**(Pt 1): 53-68.
- Miller, T. M., S. H. Kim, K. Yamanaka, M. Hester, P. Umapathi, H. Arnson, L. Rizo, J. R. Mendell, F. H. Gage, D. W. Cleveland and B. K. Kaspar (2006). "Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(51): 19546-19551.
- Miller, Z. A., V. E. Sturm, G. B. Camsari, A. Karydas, J. S. Yokoyama, L. T. Grinberg, A. L. Boxer, H. J. Rosen, K. P. Rankin, M. L. Gorno-Tempini, G. Coppola, D. H. Geschwind, R. Rademakers, W. W. Seeley, N. R. Graff-Radford and B. L. Miller (2016). "Increased prevalence of autoimmune disease within C9 and FTD/MND cohorts: Completing the picture." Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation **3**(6): e301-e301.
- Milot, J., P. Fremont, C. Cote and R. R. Tremblay (1991). "Differential modulation of carbonic anhydrase (CA III) in slow- and fast-twitch skeletal muscles of rat following denervation and reinnervation." Biochem Cell Biol **69**(10-11): 702-710.
- Mitchell, J. D. and G. D. Borasio (2007). "Amyotrophic lateral sclerosis." Lancet **369**(9578): 2031-2041.

- Mizielinska, S., T. Lashley, F. E. Norona, E. L. Clayton, C. E. Ridler, P. Fratta and A. M. Isaacs (2013). "C9orf72 frontotemporal lobar degeneration is characterised by frequent neuronal sense and antisense RNA foci." *Acta neuropathologica* **126**(6): 845-857.
- Mizutani, T., S. Sakamaki, N. Tsuchiya, S. Kamei, H. Kohzu, R. Horiuchi, M. Ida, R. Shiozawa and T. Takasu (1992). "Amyotrophic lateral sclerosis with ophthalmoplegia and multisystem degeneration in patients on long-term use of respirators." *Acta Neuropathol* **84**(4): 372-377.
- Moret, F., C. Renaudot, M. Bozon and V. Castellani (2007). "Semaphorin and neuropilin co-expression in motoneurons sets axon sensitivity to environmental semaphorin sources during motor axon pathfinding." *Development* **134**(24): 4491-4501.
- Morizawa, Y. M., Y. Hirayama, N. Ohno, S. Shibata, E. Shigetomi, Y. Sui, J. Nabekura, K. Sato, F. Okajima, H. Takebayashi, H. Okano and S. Koizumi (2017). "Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway." *Nat Commun* **8**(1): 28.
- Murakami, T., I. Nagano, T. Hayashi, Y. Manabe, M. Shoji, Y. Setoguchi and K. Abe (2001). "Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated E. coli LacZ gene in the mice carrying mutant SOD1 gene." *Neuroscience letters* **308**(3): 149-152.
- Nakamura, K., C. Nakada, K. Takeuchi, M. Osaki, K. Shomori, S. Kato, E. Ohama, K. Sato, M. Fukayama, S. Mori, H. Ito and M. Moriyama (2002). "Altered expression of cardiac ankyrin repeat protein and its homologue, ankyrin repeat protein with PEST and proline-rich region, in atrophic muscles in amyotrophic lateral sclerosis." *Pathobiology* **70**(4): 197-203.
- Namikawa, K., Q. Su, S. Kiryu-Seo and H. Kiyama (1998). "Enhanced expression of 14-3-3 family members in injured motoneurons." *Brain Res Mol Brain Res* **55**(2): 315-320.
- Navarrete, M. and A. Araque (2008). "Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication." *Neuron* **57**(6): 883-893.
- Nesvizhskii, A. I., A. Keller, E. Kolker and R. Aebersold (2003). "A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry." *Anal Chem* **75**(17): 4646-4658.
- Neumann, M., D. M. Sampathu, L. K. Kwong, A. C. Truax, M. C. Micsenyi, T. T. Chou, J. Bruce, T. Schuck, M. Grossman, C. M. Clark, L. F. McCluskey, B. L. Miller, E. Masliah, I. R. Mackenzie, H. Feldman, W. Feiden, H. A. Kretzschmar, J. Q. Trojanowski and V. M. Y. Lee (2006). "Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." *Science (New York, N.Y.)* **314**(5796): 130-133.
- Newman, Z., P. Malik, T. Y. Wu, C. Ochoa, N. Watsa and C. Lindgren (2007). "Endocannabinoids mediate muscarine-induced synaptic depression at the vertebrate neuromuscular junction." *Eur J Neurosci* **25**(6): 1619-1630.
- Ng, A. S., R. Rademakers and B. L. Miller (2015). "Frontotemporal dementia: a bridge between dementia and neuromuscular disease." *Ann N Y Acad Sci* **1338**: 71-93.
- Nijssen, J., L. H. Comley and E. Hedlund (2017). "Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis." *Acta neuropathologica* **133**(6): 863-885.
- Nimchinsky, E. A., W. G. Young, G. Yeung, R. A. Shah, J. W. Gordon, F. E. Bloom, J. H. Morrison and P. R. Hof (2000). "Differential vulnerability of oculomotor, facial, and hypoglossal nuclei in G86R superoxide dismutase transgenic mice." *J Comp Neurol* **416**(1): 112-125.
- Nishitoh, H., H. Kadowaki, A. Nagai, T. Maruyama, T. Yokota, H. Fukutomi, T. Noguchi, A. Matsuzawa, K. Takeda and H. Ichijo (2008). "ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1." *Genes & development* **22**(11): 1451-1464.

- Palma, E., J. M. Reyes-Ruiz, D. Lopercolo, C. Roseti, C. Bertollini, G. Ruffolo, P. Cifelli, E. Onesti, C. Limatola, R. Miledi and M. Inghilleri (2016). "Acetylcholine receptors from human muscle as pharmacological targets for ALS therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(11): 3060-3065.
- Parge, H. E., R. A. Hallewell and J. A. Tainer (1992). "Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 6109-6113.
- Park, J., Y. P. Yu, C. Y. Zhou, K. W. Li, D. Wang, E. Chang, D. S. Kim, B. Vo, X. Zhang, N. Gong, K. Sharp, O. Steward, I. Vitko, E. Perez-Reyes, C. Eroglu, B. Barres, F. Zaucke, G. Feng and Z. D. Luo (2016). "Central Mechanisms Mediating Thrombospondin-4-induced Pain States." J Biol Chem **291**(25): 13335-13348.
- Park, J. H., H. R. Jang, I. Y. Lee, H. K. Oh, E. J. Choi, H. Rhim and S. Kang (2017). "Amyotrophic lateral sclerosis-related mutant superoxide dismutase 1 aggregates inhibit 14-3-3-mediated cell survival by sequestration into the JUNQ compartment." Hum Mol Genet **26**(18): 3615-3629.
- Pascarella, A., G. Ferrandino, S. C. Credendino, C. Moccia, F. D'Angelo, B. Miranda, C. D'Ambrosio, P. Bielli, O. Spadaro, M. Ceccarelli, A. Scaloni, C. Sette, M. De Felice, G. De Vita and E. Amendola (2018). "DNAJC17 is localized in nuclear speckles and interacts with splicing machinery components." Sci Rep **8**(1): 7794.
- Pasinelli, P., M. E. Belford, N. Lennon, B. J. Bacskaï, B. T. Hyman, D. Trotti and R. H. Brown, Jr. (2004). "Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria." Neuron **43**(1): 19-30.
- Pasinelli, P., M. K. Houseweart, R. H. Brown and D. W. Cleveland (2000). "Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(25): 13901-13906.
- Pasquarelli, N., M. Engelskirchen, J. Hanselmann, S. Endres, C. Porazik, H. Bayer, E. Buck, M. Karsak, P. Weydt, B. Ferger and A. Witting (2017). "Evaluation of monoacylglycerol lipase as a therapeutic target in a transgenic mouse model of ALS." Neuropharmacology **124**: 157-169.
- Patten, S. A., D. Aggad, J. Martinez, E. Tremblay, J. Petrillo, G. A. Armstrong, A. La Fontaine, C. Maios, M. Liao, S. Ciura, X. Y. Wen, V. Rafuse, J. Ichida, L. Zinman, J. P. Julien, E. Kabashi, R. Robitaille, L. Korngut, J. A. Parker and P. Drapeau (2017). "Neuroleptics as therapeutic compounds stabilizing neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis." JCI Insight **2**(22).
- Perez-Gonzalez, A., F. Provost, I. Rouse, O. Benzina, H. Darabid, B. Lamoureux, D. Arbour and R. Robitaille (in prep). "Muscarinic Adaptation of Perisynaptic Schwann Cell in response to neuromuscular junction's injury in normal and pathological conditions of Amyotrophic Lateral Sclerosis."
- Perlson, E., G.-B. Jeong, J. L. Ross, R. Dixit, K. E. Wallace, R. G. Kalb and E. L. F. Holzbaur (2009). "A switch in retrograde signaling from survival to stress in rapid-onset neurodegeneration." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **29**(31): 9903-9917.
- Pfeiffer, T., E. Avignone and U. V. Nagerl (2016). "Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines." Sci Rep **6**: 32422.

- Pickering, M., D. Cumiskey and J. J. O'Connor (2005). "Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system." Experimental physiology **90**(5): 663-670.
- Pickles, S., S. Semmler, H. R. Broom, L. Destroismaisons, L. Legroux, N. Arbour, E. Meiering, N. R. Cashman and C. Vande Velde (2016). "ALS-linked misfolded SOD1 species have divergent impacts on mitochondria." Acta Neuropathol Commun **4**(1): 43.
- Pinder, R. M., R. N. Brogden, R. Swayer, T. M. Speight, R. Spencer and G. S. Avery (1976). "Pimozide: a review of its pharmacological properties and therapeutic uses in psychiatry." Drugs **12**(1): 1-40.
- Pinheiro, J., D. Bates, S. DebRoy and S. V. Heisterkamp "Package "nlme."
- Pinto, S., A. Pinto and M. De Carvalho (2007). "Do bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis patients have an earlier respiratory involvement than spinal-onset amyotrophic lateral sclerosis patients?" Eura Medicophys **43**(4): 505-509.
- Plachta, N., C. Annaheim, S. Bissière, S. Lin, M. Rüegg, S. Hoving, D. Müller, F. Poirier, M. Bibbel and Y.-A. Barde (2007). "Identification of a lectin causing the degeneration of neuronal processes using engineered embryonic stem cells." Nature Neuroscience **10**(6): 712-719.
- Plomp, J. J., G. T. van Kempen and P. C. Molenaar (1992). "Adaptation of quantal content to decreased postsynaptic sensitivity at single endplates in alpha-bungarotoxin-treated rats." J Physiol **458**: 487-499.
- Plubell, D. L., P. A. Wilmarth, Y. Zhao, A. M. Fenton, J. Minnier, A. P. Reddy, J. Klimek, X. Yang, L. L. David and N. Pamir (2017). "Extended Multiplexing of Tandem Mass Tags (TMT) Labeling Reveals Age and High Fat Diet Specific Proteome Changes in Mouse Epididymal Adipose Tissue." Mol Cell Proteomics **16**(5): 873-890.
- Polymenidou, M., C. Lagier-Tourenne, K. R. Hutt, S. C. Huelga, J. Moran, T. Y. Liang, S.-C. Ling, E. Sun, E. Wancewicz, C. Mazur, H. Kordasiewicz, Y. Sedaghat, J. P. Donohue, L. Shiue, C. F. Bennett, G. W. Yeo and D. W. Cleveland (2011). "Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43." Nature neuroscience **14**(4): 459-468.
- Prudencio, M., P. J. Hart, D. R. Borchelt and P. M. Andersen (2009). "Variation in aggregation propensities among ALS-associated variants of SOD1: correlation to human disease." Hum Mol Genet **18**(17): 3217-3226.
- Pun, S., A. F. Santos, S. Saxena, L. Xu and P. Caroni (2006). "Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF." Nature neuroscience **9**(3): 408-419.
- Radunović, A. and P. N. Leigh (1996). "Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis: correlation between genotype and clinical features." J Neurol Neurosurg Psychiatry **61**(6): 565-572.
- Ragagnin, A. M. G., S. Shadfar, M. Vidal, M. S. Jamali and J. D. Atkin (2019). "Motor Neuron Susceptibility in ALS/FTD." Frontiers in Neuroscience **13**(532).
- Ralph, G. S., P. A. Radcliffe, D. M. Day, J. M. Carthy, M. A. Leroux, D. C. P. Lee, L.-F. Wong, L. G. Bilsland, L. Greensmith, S. M. Kingsman, K. A. Mitrophanous, N. D. Mazarakis and M. Azzouz (2005). "Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model." Nature medicine **11**(4): 429-433.

- Ramirez, B. G., C. Blazquez, T. Gomez del Pulgar, M. Guzman and M. L. de Ceballos (2005). "Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation." *J Neurosci* **25**(8): 1904-1913.
- Reddy, L. V., S. Koirala, Y. Sugiura, A. A. Herrera and C. P. Ko (2003). "Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo." *Neuron* **40**(3): 563-580.
- Renton, A. E., A. Chio and B. J. Traynor (2014). "State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics." *Nat Neurosci* **17**(1): 17-23.
- Risher, W. C. and C. Eroglu (2012). "Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system." *Matrix Biol* **31**(3): 170-177.
- Risher, W. C., N. Kim, S. Koh, J. E. Choi, P. Mitev, E. F. Spence, L. J. Pilaz, D. Wang, G. Feng, D. L. Silver, S. H. Soderling, H. H. Yin and C. Eroglu (2018). "Thrombospondin receptor alpha2delta-1 promotes synaptogenesis and spinogenesis via postsynaptic Rac1." *J Cell Biol* **217**(10): 3747-3765.
- Rizzu, P., C. Blauwendraat, S. Heetveld, E. M. Lynes, M. Castillo-Lizardo, A. Dhingra, E. Pyz, M. Hobert, M. Synofzik, J. Simón-Sánchez, M. Francescatto and P. Heutink (2016). "C9orf72 is differentially expressed in the central nervous system and myeloid cells and consistently reduced in C9orf72, MAPT and GRN mutation carriers." *Acta neuropathologica communications* **4**(1): 37-37.
- Robinson, D. A. (1970). "Oculomotor unit behavior in the monkey." *J Neurophysiol* **33**(3): 393-403.
- Robitaille, R. (1995). "Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction." *J Neurosci* **15**(11): 7121-7131.
- Robitaille, R. (1998). "Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction." *Neuron* **21**(4): 847-855.
- Robitaille, R., M. J. Bourque and S. Vandaele (1996). "Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction." *J Neurosci* **16**(1): 148-158.
- Robitaille, R., B. S. Jahromi and M. P. Charlton (1997). "Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction." *J Physiol* **504** (Pt 2): 337-347.
- Rocha, M. C., P. A. Pousinha, A. M. Correia, A. M. Sebastiao and J. A. Ribeiro (2013). "Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset." *PLoS One* **8**(9): e73846.
- Rochat, C., N. Bernard-Marissal and B. L. Schneider (2016). "Selective Vulnerability of Neuronal Subtypes in ALS: A Fertile Ground for the Identification of Therapeutic Targets." *Update on Amyotrophic Lateral Sclerosis*: 165.
- Rochon, D., I. Rousse and R. Robitaille (2001). "Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction." *J Neurosci* **21**(11): 3819-3829.
- Rodriguez-Cueto, C., I. Santos-Garcia, L. Garcia-Toscano, F. Espejo-Porras, M. Bellido, J. Fernandez-Ruiz, E. Munoz and E. de Lago (2018). "Neuroprotective effects of the cannabigerol quinone derivative VCE-003.2 in SOD1(G93A) transgenic mice, an experimental model of amyotrophic lateral sclerosis." *Biochem Pharmacol* **157**: 217-226.
- Rooney, J., T. Burke, A. Vajda, M. Heverin and O. Hardiman (2017). "What does the ALSFRS-R really measure? A longitudinal and survival analysis of functional dimension subscores in amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **88**(5): 381-385.

- Roots, B. (1983). "Neurofilament accumulation induced in synapses by leupeptin." Science **221**(4614): 971-972.
- Rosen, D. R., T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O'Regan and H. X. Deng (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." Nature **362**(6415): 59-62.
- Rossi, A. C., C. Mammucari, C. Argentini, C. Reggiani and S. Schiaffino (2010). "Two novel/ancient myosins in mammalian skeletal muscles: MYH14/7b and MYH15 are expressed in extraocular muscles and muscle spindles." J Physiol **588**(Pt 2): 353-364.
- Rothstein, J. D., L. J. Martin and R. W. Kuncl (1992). "Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis." The New England journal of medicine **326**(22): 1464-1468.
- Rothstein, J. D., M. Van Kammen, A. I. Levey, L. J. Martin and R. W. Kuncl (1995). "Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis." Ann Neurol **38**(1): 73-84.
- Rotshenker, S. (2009). "The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease." J Mol Neurosci **39**(1-2): 99-103.
- Rotshenker, S. (2011). "Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury." J Neuroinflammation **8**: 109.
- Rousse, I. and R. Robitaille (2006). "Calcium signaling in Schwann cells at synaptic and extra-synaptic sites: active glial modulation of neuronal activity." Glia **54**(7): 691-699.
- Rousse, I., A. St-Amour, H. Darabid and R. Robitaille (2010). "Synapse–glia interactions are governed by synaptic and intrinsic glial properties." Neuroscience **167**(3): 621-632.
- Rueggsegger, C., N. Maharjan, A. Goswami, A. Filezac de L'Etang, J. Weis, D. Troost, M. Heller, H. Gut and S. Saxena (2016). "Aberrant association of misfolded SOD1 with Na(+)/K(+)ATPase- α 3 impairs its activity and contributes to motor neuron vulnerability in ALS." Acta Neuropathol **131**(3): 427-451.
- Sanchez-Pastor, E., X. Trujillo, M. Huerta and F. Andrade (2007). "Effects of cannabinoids on synaptic transmission in the frog neuromuscular junction." J Pharmacol Exp Ther **321**(2): 439-445.
- Sandrock, A. W., Jr., S. E. Dryer, K. M. Rosen, S. N. Gozani, R. Kramer, L. E. Theill and G. D. Fischbach (1997). "Maintenance of acetylcholine receptor number by neuregulins at the neuromuscular junction in vivo." Science **276**(5312): 599-603.
- Sanes, J. R. and J. W. Lichtman (2001). "Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus." Nat Rev Neurosci **2**(11): 791-805.
- Saxena, S., F. Roselli, K. Singh, K. Leptien, J. P. Julien, F. Gros-Louis and P. Caroni (2013). "Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival." Neuron **80**(1): 80-96.
- Scekic-Zahirovic, J., H. E. Oussini, S. Mersmann, K. Drenner, M. Wagner, Y. Sun, K. Allmeroth, S. Dieterle, J. Sinniger, S. Dirrig-Grosch, F. Rene, D. Dormann, C. Haass, A. C. Ludolph, C. Lagier-Tourenne, E. Storkebaum and L. Dupuis (2017). "Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis." Acta Neuropathol **133**(6): 887-906.
- Schaefer, A. M., J. R. Sanes and J. W. Lichtman (2005). "A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." J Comp Neurol **490**(3): 209-219.

- Schafer, D. P., E. K. Lehrman, A. G. Kautzman, R. Koyama, A. R. Mardinly, R. Yamasaki, R. M. Ransohoff, M. E. Greenberg, B. A. Barres and B. Stevens (2012). "Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner." Neuron **74**(4): 691-705.
- Schipper, L. J., J. Raaphorst, E. Aronica, F. Baas, R. de Haan, M. de Visser and D. Troost (2016). "Prevalence of brain and spinal cord inclusions, including dipeptide repeat proteins, in patients with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: a systematic neuropathological review." Neuropathology and applied neurobiology **42**(6): 547-560.
- Shahidullah, M., S. J. Le Marchand, H. Fei, J. Zhang, U. B. Pandey, M. B. Dalva, P. Pasinelli and I. B. Levitan (2013). "Defects in Synapse Structure and Function Precede Motor Neuron Degeneration in *Drosophila* Models of FUS-Related ALS." The Journal of Neuroscience **33**(50): 19590-19598.
- Shapiro, A. K., E. Shapiro and G. Fulop (1987). "Pimozide treatment of tic and Tourette disorders." Pediatrics **79**(6): 1032-1039.
- Shi, Y., S. Lin, K. A. Staats, Y. Li, W. H. Chang, S. T. Hung, E. Hendricks, G. R. Linares, Y. Wang, E. Y. Son, X. Wen, K. Kisler, B. Wilkinson, L. Menendez, T. Sugawara, P. Woolwine, M. Huang, M. J. Cowan, B. Ge, N. Koutsodendris, K. P. Sandor, J. Komberg, V. R. Vangoor, K. Senthilkumar, V. Hennes, C. Seah, A. R. Nelson, T. Y. Cheng, S. J. Lee, P. R. August, J. A. Chen, N. Wisniewski, V. Hanson-Smith, T. G. Belgard, A. Zhang, M. Coba, C. Grunseich, M. E. Ward, L. H. van den Berg, R. J. Pasterkamp, D. Trotti, B. V. Zlokovic and J. K. Ichida (2018). "Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons." Nat Med **24**(3): 313-325.
- Shigetomi, E., E. A. Bushong, M. D. Haustein, X. Tong, O. Jackson-Weaver, S. Kracun, J. Xu, M. V. Sofroniew, M. H. Ellisman and B. S. Khakh (2013). "Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses." J Gen Physiol **141**(5): 633-647.
- Shimizu, T., S. I. Pastuhov, H. Hanafusa, K. Matsumoto and N. Hisamoto (2018). "The C. elegans BRCA2-ALP/Enigma Complex Regulates Axon Regeneration via a Rho GTPase-ROCK-MLC Phosphorylation Pathway." Cell Rep **24**(7): 1880-1889.
- Shoenfeld, L., R. E. Westenbroek, E. Fisher, K. A. Quinlan, V. M. Tysseling, R. K. Powers, C. J. Heckman and M. D. Binder (2014). "Soma size and Cav1.3 channel expression in vulnerable and resistant motoneuron populations of the SOD1G93A mouse model of ALS." Physiol Rep **2**(8).
- Singh, A., R. Kukreti, L. Saso and S. Kukreti (2019). "Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases." Molecules **24**(8).
- Smith, I. W., M. Mikes, Y. Lee and W. J. Thompson (2013). "Terminal Schwann cells participate in the competition underlying neuromuscular synapse elimination." J Neurosci **33**(45): 17724-17736.
- Son, H. G., K. Seo, M. Seo, S. Park, S. Ham, S. W. A. An, E. S. Choi, Y. Lee, H. Baek, E. Kim, Y. Ryu, C. M. Ha, A. L. Hsu, T. Y. Roh, S. K. Jang and S. V. Lee (2018). "Prefoldin 6 mediates longevity response from heat shock factor 1 to FOXO in C. elegans." Genes Dev **32**(23-24): 1562-1575.
- Son, Y. J. and W. J. Thompson (1995). "Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells." Neuron **14**(1): 133-141.
- Son, Y. J. and W. J. Thompson (1995). "Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons." Neuron **14**(1): 125-132.

- Son, Y. J., J. T. Trachtenberg and W. J. Thompson (1996). "Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions." Trends Neurosci **19**(7): 280-285.
- Song, J. W., T. Misgeld, H. Kang, S. Knecht, J. Lu, Y. Cao, S. L. Cotman, D. L. Bishop and J. W. Lichtman (2008). "Lysosomal activity associated with developmental axon pruning." J Neurosci **28**(36): 8993-9001.
- Souayah, N., K. M. Coakley, R. Chen, N. Ende and J. J. McArdle (2012). "Defective neuromuscular transmission in the SOD1 G93A transgenic mouse improves after administration of human umbilical cord blood cells." Stem Cell Rev Rep **8**(1): 224-228.
- Spiller, K. J., C. J. Cheung, C. R. Restrepo, L. K. Kwong, A. M. Stieber, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2016). "Selective Motor Neuron Resistance and Recovery in a New Inducible Mouse Model of TDP-43 Proteinopathy." J Neurosci **36**(29): 7707-7717.
- Sterne, G. D., G. R. Coulton, R. A. Brown, C. J. Green and G. Terenghi (1997). "Neurotrophin-3-enhanced nerve regeneration selectively improves recovery of muscle fibers expressing myosin heavy chains 2b." J Cell Biol **139**(3): 709-715.
- Sugiura, Y. and W. Lin (2011). "Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function." Biosci Rep **31**(5): 295-302.
- Sullivan, P. M., X. Zhou, A. M. Robins, D. H. Paushter, D. Kim, M. B. Smolka and F. Hu (2016). "The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway." Acta neuropathologica communications **4**(1): 51-51.
- Szklarczyk, D., A. L. Gable, D. Lyon, A. Junge, S. Wyder, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, N. T. Doncheva, J. H. Morris, P. Bork, L. J. Jensen and C. V. Mering (2019). "STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets." Nucleic Acids Res **47**(D1): D607-d613.
- Taetzsch, T., M. J. Tenga and G. Valdez (2017). "Muscle Fibers Secrete FGFBP1 to Slow Degeneration of Neuromuscular Synapses during Aging and Progression of ALS." J Neurosci **37**(1): 70-82.
- Talbott, E. O., A. M. Malek and D. Lacomis (2016). "The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis." Handb Clin Neurol **138**: 225-238.
- Tallon, C., K. A. Russell, S. Sakhalkar, N. Andrapallayal and M. H. Farah (2016). "Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice." Neuroscience **312**: 179-189.
- Tan, R. H., Y. D. Ke, L. M. Ittner and G. M. Halliday (2017). "ALS/FTLD: experimental models and reality." Acta neuropathologica **133**(2): 177-196.
- Taylor, J. P., R. H. Brown, Jr. and D. W. Cleveland (2016). "Decoding ALS: from genes to mechanism." Nature **539**(7628): 197-206.
- Tilleux, S. and E. Hermans (2007). "Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders." Journal of neuroscience research **85**(10): 2059-2070.
- Todd, K. J., H. Darabid and R. Robitaille (2010). "Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction." J Neurosci **30**(35): 11870-11882.
- Towne, C., C. Raoul, B. L. Schneider and P. Aebischer (2008). "Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice." Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy **16**(6): 1018-1025.

- Traynor, B. J., M. B. Codd, B. Corr, C. Forde, E. Frost and O. M. Hardiman (2000). "Clinical Features of Amyotrophic Lateral Sclerosis According to the El Escorial and Airlie House Diagnostic Criteria: A Population-Based Study." Archives of Neurology **57**(8): 1171-1176.
- Tremblay, E., E. Martineau and R. Robitaille (2017). "Opposite Synaptic Alterations at the Neuromuscular Junction in an ALS Mouse Model: When Motor Units Matter." J Neurosci **37**(37): 8901-8918.
- Tummala, H., C. Jung, A. Tiwari, C. M. J. Higgins, L. J. Hayward and Z. Xu (2005). "Inhibition of chaperone activity is a shared property of several Cu,Zn-superoxide dismutase mutants that cause amyotrophic lateral sclerosis." The Journal of biological chemistry **280**(18): 17725-17731.
- Turkanis, S. A. and R. Karler (1986). "Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neuromuscular transmission in the frog." Neuropharmacology **25**(11): 1273-1278.
- Turner, B. J., S. Ackerley, K. E. Davies and K. Talbot (2010). "Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice." Hum Mol Genet **19**(5): 815-824.
- Turner, B. J. and K. Talbot (2008). "Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS." Progress in neurobiology **85**(1): 94-134.
- Turner, M. R., A. Cagnin, F. E. Turkheimer, C. C. J. Miller, C. E. Shaw, D. J. Brooks, P. N. Leigh and R. B. Banati (2004). "Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study." Neurobiology of disease **15**(3): 601-609.
- UniProt Consortium, T. (2018). "UniProt: the universal protein knowledgebase." Nucleic Acids Research **46**(5): 2699-2699.
- Van Hoecke, A., L. Schoonaert, R. Lemmens, M. Timmers, K. A. Staats, A. S. Laird, E. Peeters, T. Philips, A. Goris, B. Dubois, P. M. Andersen, A. Al-Chalabi, V. Thijs, A. M. Turnley, P. W. van Vught, J. H. Veldink, O. Hardiman, L. Van Den Bosch, P. Gonzalez-Perez, P. Van Damme, R. H. Brown, Jr., L. H. van den Berg and W. Robberecht (2012). "EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans." Nat Med **18**(9): 1418-1422.
- Vande Velde, C., M. L. Garcia, X. Yin, B. D. Trapp and D. W. Cleveland (2004). "The neuroprotective factor Wlds does not attenuate mutant SOD1-mediated motor neuron disease." Neuromolecular medicine **5**(3): 193-203.
- Vande Velde, C., T. M. Miller, N. R. Cashman and D. W. Cleveland (2008). "Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(10): 4022-4027.
- Venkova, K., A. Christov, Z. Kamaluddin, P. Kobalka, S. Siddiqui and K. Hensley (2014). "Semaphorin 3A signaling through neuropilin-1 is an early trigger for distal axonopathy in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." J Neuropathol Exp Neurol **73**(7): 702-713.
- Vinsant, S., C. Mansfield, R. Jimenez-Moreno, V. Del Gaizo Moore, M. Yoshikawa, T. G. Hampton, D. Prevette, J. Caress, R. W. Oppenheim and C. Milligan (2013). "Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part I, background and methods." Brain Behav **3**(4): 335-350.

- Vucic, S., G. A. Nicholson and M. C. Kiernan (2008). "Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis." Brain **131**(Pt 6): 1540-1550.
- Wang, H.-Y., I. F. Wang, J. Bose and C. K. J. Shen (2004). "Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family." Genomics **83**(1): 130-139.
- Wang, J., H. Slunt, V. Gonzales, D. Fromholt, M. Coonfield, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and D. R. Borchelt (2003). "Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature." Human molecular genetics **12**(21): 2753-2764.
- Wang, L., P. Pytel, M. L. Feltri, L. Wrabetz and R. P. Roos (2012). "Selective knockdown of mutant SOD1 in Schwann cells ameliorates disease in G85R mutant SOD1 transgenic mice." Neurobiol Dis **48**(1): 52-57.
- Wang, L., K. Sharma, G. Grisotti and R. P. Roos (2009). "The effect of mutant SOD1 dismutase activity on non-cell autonomous degeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis." Neurobiology of disease **35**(2): 234-240.
- Wang, Q., J. L. Johnson, N. Y. Agar and J. N. Agar (2008). "Protein aggregation and protein instability govern familial amyotrophic lateral sclerosis patient survival." PLoS Biol **6**(7): e170.
- Watanabe, M., M. Dykes-Hoberg, V. C. Culotta, D. L. Price, P. C. Wong and J. D. Rothstein (2001). "Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues." Neurobiology of disease **8**(6): 933-941.
- Webster, C. P., E. F. Smith, C. S. Bauer, A. Moller, G. M. Hautbergue, L. Ferraiuolo, M. A. Myszczyńska, A. Higginbottom, M. J. Walsh, A. J. Whitworth, B. K. Kaspar, K. Meyer, P. J. Shaw, A. J. Grierson and K. J. De Vos (2016). "The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy." The EMBO journal **35**(15): 1656-1676.
- Werle, M. J. and M. VanSaun (2003). "Activity dependent removal of agrin from synaptic basal lamina by matrix metalloproteinase 3." Journal of Neurocytology **32**(5): 905-913.
- Westenbroek, R. E., L. Hoskins and W. A. Catterall (1998). "Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals." J Neurosci **18**(16): 6319-6330.
- Whim, M. D. and P. E. Lloyd (1989). "Frequency-dependent release of peptide cotransmitters from identified cholinergic motor neurons in Aplysia." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 9034-9038.
- Williamson, T. L. and D. W. Cleveland (1999). "Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons." Nature neuroscience **2**(1): 50-56.
- Witting, A., P. Weydt, S. Hong, M. Kliot, T. Moller and N. Stella (2004). "Endocannabinoids accumulate in spinal cord of SOD1 G93A transgenic mice." J Neurochem **89**(6): 1555-1557.
- Wong, M. and L. J. Martin (2010). "Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice." Hum Mol Genet **19**(11): 2284-2302.
- Wong, P. C., C. A. Pardo, D. R. Borchelt, M. K. Lee, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, S. S. Sisodia, D. W. Cleveland and D. L. Price (1995). "An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria." Neuron **14**(6): 1105-1116.

- Wood, S. J. and C. R. Slater (2001). "Safety factor at the neuromuscular junction." Prog Neurobiol **64**(4): 393-429.
- Wright, D. E. and W. D. Snider (1996). "Focal expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in developing mouse limb bud." Cell Tissue Res **286**(2): 209-217.
- Wright, M. C., S. Potluri, X. Wang, E. Dentcheva, D. Gautam, A. Tessler, J. Wess, M. M. Rich and Y. J. Son (2009). "Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses." J Neurosci **29**(47): 14942-14955.
- Wu, H., Y. Lu, C. Shen, N. Patel, L. Gan, W. C. Xiong and L. Mei (2012). "Distinct roles of muscle and motoneuron LRP4 in neuromuscular junction formation." Neuron **75**(1): 94-107.
- Xu, W. and D. Lipscombe (2001). "Neuronal $\text{Ca}_v1.3$ L-Type Channels Activate at Relatively Hyperpolarized Membrane Potentials and Are Incompletely Inhibited by Dihydropyridines." The Journal of Neuroscience **21**(16): 5944-5951.
- Yamanaka, K., S. J. Chun, S. Boillee, N. Fujimori-Tonou, H. Yamashita, D. H. Gutmann, R. Takahashi, H. Misawa and D. W. Cleveland (2008). "Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis." Nat Neurosci **11**(3): 251-253.
- Yang, J. S., J. T. Sladky, R. G. Kallen and R. L. Barchi (1991). "TTX-sensitive and TTX-insensitive sodium channel mRNA transcripts are independently regulated in adult skeletal muscle after denervation." Neuron **7**(3): 421-427.
- Yang, Y., O. Gozen, A. Watkins, I. Lorenzini, A. Lepore, Y. Gao, S. Vidensky, J. Brennan, D. Poulsen, J. Won Park, N. Li Jeon, M. B. Robinson and J. D. Rothstein (2009). "Presynaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1." Neuron **61**(6): 880-894.
- Yiangou, Y., P. Facer, P. Durrenberger, I. P. Chessell, A. Naylor, C. Bountra, R. R. Banati and P. Anand (2006). "COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord." BMC Neurol **6**: 12.
- Yoshino, H. (2019). "Edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis." Expert Review of Neurotherapeutics **19**(3): 185-193.
- Yuan, A., M. V. Rao, Veeranna and R. A. Nixon (2017). "Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **9**(4).
- Yuan, A., H. Serksen, Veeranna, B. S. Basavarajappa, A. Kumar, A. Hashim, M. Berg, J. H. Lee, Y. Sato, M. V. Rao, P. S. Mohan, V. Dyakin, J. P. Julien, V. M. Lee and R. A. Nixon (2015). "Neurofilament subunits are integral components of synapses and modulate neurotransmission and behavior in vivo." Mol Psychiatry **20**(8): 986-994.
- Zhou, Y., D. Liu and H. J. Kaminski (2010). "Myosin heavy chain expression in mouse extraocular muscle: more complex than expected." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(12): 6355-6363.
- Zhou, Y., D. Liu and H. J. Kaminski (2011). "Pitx2 regulates myosin heavy chain isoform expression and multi-innervation in extraocular muscle." J Physiol **589**(Pt 18): 4601-4614.
- Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **362**(4-5): 299-309.
- Zimmermann, L., C. J. Morado-Diaz, M. A. Davis-Lopez de Carrizosa, R. R. de la Cruz, P. J. May, J. Streicher, A. M. Pastor and R. Blumer (2013). "Axons giving rise to the palisade endings of feline extraocular muscles display motor features." J Neurosci **33**(7): 2784-2793.

- Zucker, R. S. and W. G. Regehr (2002). "Short-term synaptic plasticity." Annu Rev Physiol **64**: 355-405.
- Zwiegers, P., G. Lee and C. A. Shaw (2014). "Reduction in hSOD1 copy number significantly impacts ALS phenotype presentation in G37R (line 29) mice: implications for the assessment of putative therapeutic agents." J Negat Results Biomed **13**: 14.

Chapitre 5 - Annexes

Tableau 5.1 Enrichissement des processus, fonctions et composantes intracellulaires des 635 protéines qui sont augmentés dans le EOM WT versus EDL WT (p-value < 0.0001; GOrilla)

GO PROCESS			
GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0044281	small molecule metabolic process	1,03E-10	9,11E-07
GO:0006082	organic acid metabolic process	2,01E-10	8,85E-07
GO:0043436	oxoacid metabolic process	4,58E-10	1,35E-06
GO:0016054	organic acid catabolic process	4,92E-10	1,08E-06
GO:0046395	carboxylic acid catabolic process	4,92E-10	8,68E-07
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	5,67E-10	8,33E-07
GO:0006101	citrate metabolic process	8,13E-09	1,02E-05
GO:0072350	tricarboxylic acid metabolic process	1,05E-08	1,16E-05
GO:0034440	lipid oxidation	1,49E-08	1,46E-05
GO:0019395	fatty acid oxidation	1,49E-08	1,31E-05
GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	2,49E-08	1,99E-05
GO:0006635	fatty acid beta-oxidation	3,12E-08	2,29E-05
GO:0043648	dicarboxylic acid metabolic process	3,58E-08	2,43E-05
GO:0009063	cellular amino acid catabolic process	1,11E-07	7,01E-05
GO:0034220	ion transmembrane transport	1,55E-07	9,09E-05
GO:0055114	oxidation-reduction process	1,71E-07	9,43E-05
GO:0009062	fatty acid catabolic process	3,06E-07	1,59E-04
GO:0051186	cofactor metabolic process	4,95E-07	2,42E-04
GO:0006631	fatty acid metabolic process	8,01E-07	3,72E-04
GO:0055085	transmembrane transport	8,88E-07	3,91E-04
GO:0017144	drug metabolic process	9,05E-07	3,80E-04
GO:0072329	monocarboxylic acid catabolic process	1,45E-06	5,82E-04
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	1,94E-06	7,43E-04
GO:0030258	lipid modification	2,20E-06	8,07E-04
GO:0006732	coenzyme metabolic process	3,84E-06	1,35E-03
GO:0098655	cation transmembrane transport	4,28E-06	1,45E-03
GO:0044282	small molecule catabolic process	4,91E-06	1,60E-03
GO:0015672	monovalent inorganic cation transport	6,49E-06	2,05E-03
GO:0006103	2-oxoglutarate metabolic process	7,40E-06	2,25E-03
GO:0006811	ion transport	8,24E-06	2,42E-03
GO:0098660	inorganic ion transmembrane transport	8,63E-06	2,45E-03
GO:0033539	fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase	1,07E-05	2,94E-03
GO:1901606	alpha-amino acid catabolic process	1,58E-05	4,22E-03

GO:0042133	neurotransmitter metabolic process	1,64E-05	4,26E-03
GO:0008016	regulation of heart contraction	2,16E-05	5,45E-03
GO:0098662	inorganic cation transmembrane transport	3,37E-05	8,25E-03
GO:0006122	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	3,83E-05	9,12E-03
GO:0006733	oxidoreduction coenzyme metabolic process	5,12E-05	1,19E-02
GO:0006937	regulation of muscle contraction	7,21E-05	1,63E-02
GO:0009065	glutamine family amino acid catabolic process	8,00E-05	1,76E-02
GO:0006812	cation transport	8,67E-05	1,87E-02
GO:0001505	regulation of neurotransmitter levels	8,72E-05	1,83E-02
GO:1903115	regulation of actin filament-based movement	1,25E-04	2,56E-02
GO:0015985	energy coupled proton transport, down electrochemical gradient	1,29E-04	2,58E-02
GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport	1,29E-04	2,52E-02
GO:0055117	regulation of cardiac muscle contraction	1,29E-04	2,47E-02
GO:0016999	antibiotic metabolic process	1,40E-04	2,63E-02
GO:0009117	nucleotide metabolic process	1,52E-04	2,80E-02
GO:0019637	organophosphate metabolic process	1,74E-04	3,13E-02
GO:1902600	proton transmembrane transport	1,87E-04	3,29E-02
GO:0006942	regulation of striated muscle contraction	2,56E-04	4,43E-02
GO:0042407	cristae formation	2,59E-04	4,39E-02
GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process	2,89E-04	4,81E-02

GO FUNCTIONS			
GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0048037	cofactor binding	2,46E-11	5,60E-08
GO:0050662	coenzyme binding	2,12E-09	2,42E-06
GO:0016491	oxidoreductase activity	2,13E-09	1,62E-06
GO:0015075	ion transmembrane transporter activity	6,05E-08	3,45E-05
GO:0022857	transmembrane transporter activity	7,24E-08	3,30E-05
GO:0015318	inorganic molecular entity transmembrane transporter activity	2,49E-07	9,47E-05
GO:0003824	catalytic activity	4,82E-07	1,57E-04
GO:0022804	active transmembrane transporter activity	5,57E-07	1,59E-04
GO:0005215	transporter activity	3,71E-06	9,38E-04
GO:0008324	cation transmembrane transporter activity	1,54E-05	3,52E-03
GO:0050660	flavin adenine dinucleotide binding	1,69E-05	3,51E-03
GO:0043492	ATPase activity, coupled to movement of substances	2,02E-05	3,83E-03
GO:0042626	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances	2,02E-05	3,53E-03

GO:0022853	active ion transmembrane transporter activity	3,65E-05	5,94E-03
GO:0042625	ATPase coupled ion transmembrane transporter activity	3,65E-05	5,55E-03
GO:0019829	cation-transporting ATPase activity	3,65E-05	5,20E-03
GO:0008514	organic anion transmembrane transporter activity	4,32E-05	5,78E-03
GO:0022890	inorganic cation transmembrane transporter activity	4,74E-05	6,00E-03
GO:0005342	organic acid transmembrane transporter activity	8,00E-05	9,59E-03
GO:0046943	carboxylic acid transmembrane transporter activity	8,00E-05	9,11E-03
GO:0036094	small molecule binding	9,24E-05	1,00E-02
GO:0015399	primary active transmembrane transporter activity	1,28E-04	1,32E-02
GO:0015405	P-P-bond-hydrolysis-driven transmembrane transporter activity	1,28E-04	1,27E-02
GO:0016627	oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	1,56E-04	1,49E-02
GO:0051540	metal cluster binding	1,56E-04	1,43E-02
GO:0051536	iron-sulfur cluster binding	1,56E-04	1,37E-02
GO:0015077	monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity	1,78E-04	1,50E-02
GO:0016746	transferase activity, transferring acyl groups	2,19E-04	1,78E-02
GO:0042623	ATPase activity, coupled	3,38E-04	2,65E-02
GO:0015662	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism	3,50E-04	2,66E-02
GO:0015291	secondary active transmembrane transporter activity	3,55E-04	2,61E-02
GO:0043167	ion binding	4,22E-04	3,00E-02
GO:0005509	calcium ion binding	5,36E-04	3,70E-02
GO:0051287	NAD binding	7,35E-04	4,92E-02
GO:0046873	metal ion transmembrane transporter activity	7,35E-04	4,78E-02
GO:0009055	electron transfer activity	8,48E-04	4,95E-02
GO:0016887	ATPase activity	8,69E-04	4,95E-02

GO COMPONENT			
GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0005739	mitochondrion	3,41E-33	4,23E-30
GO:0044429	mitochondrial part	6,12E-23	3,80E-20
GO:0031966	mitochondrial membrane	1,53E-21	6,31E-19
GO:0005743	mitochondrial inner membrane	1,32E-19	4,10E-17
GO:0019866	organelle inner membrane	3,41E-19	8,47E-17
GO:0043209	myelin sheath	5,99E-13	1,24E-10
GO:0031090	organelle membrane	9,17E-13	1,63E-10
GO:0005759	mitochondrial matrix	2,77E-09	4,30E-07

GO:0016020	membrane	2,62E-07	3,61E-05
GO:0045259	proton-transporting ATP synthase complex	6,65E-07	8,25E-05
GO:0005753	mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex	6,65E-07	7,50E-05
GO:0045239	tricarboxylic acid cycle enzyme complex	8,28E-07	8,56E-05
GO:0043233	organelle lumen	1,19E-06	1,14E-04
GO:0070013	intracellular organelle lumen	1,19E-06	1,06E-04
GO:0031974	membrane-enclosed lumen	1,19E-06	9,85E-05
GO:0016021	integral component of membrane	1,37E-06	1,07E-04
GO:0044455	mitochondrial membrane part	1,39E-06	1,01E-04
GO:0031224	intrinsic component of membrane	1,54E-06	1,06E-04
GO:0098798	mitochondrial protein complex	4,25E-06	2,78E-04
GO:0045275	respiratory chain complex III	1,07E-05	6,62E-04
GO:0044444	cytoplasmic part	2,92E-05	1,73E-03
GO:0005750	mitochondrial respiratory chain complex III	3,83E-05	2,16E-03
GO:0016469	proton-transporting two-sector ATPase complex	4,64E-05	2,50E-03
GO:0044425	membrane part	6,17E-05	3,19E-03
GO:0042645	mitochondrial nucleoid	6,66E-05	3,31E-03
GO:0009295	nucleoid	6,66E-05	3,18E-03
GO:0005901	caveola	7,82E-05	3,59E-03
GO:0099056	integral component of presynaptic membrane	1,37E-04	6,07E-03
GO:0045240	dihydrolipoyl dehydrogenase complex	1,37E-04	5,86E-03
GO:0042383	sarcolemma	2,55E-04	1,05E-02
GO:0098889	intrinsic component of presynaptic membrane	2,59E-04	1,04E-02
GO:0070069	cytochrome complex	2,93E-04	1,14E-02
GO:0005887	integral component of plasma membrane	3,24E-04	1,22E-02
GO:0031226	intrinsic component of plasma membrane	3,38E-04	1,23E-02
GO:0044853	plasma membrane raft	3,42E-04	1,21E-02
GO:0030062	mitochondrial tricarboxylic acid cycle enzyme complex	4,90E-04	1,69E-02
GO:0098800	inner mitochondrial membrane protein complex	5,23E-04	1,75E-02
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	8,00E-04	2,61E-02
GO:0000276	mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)	8,28E-04	2,63E-02
GO:0045263	proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)	8,28E-04	2,57E-02

Tableau 5.2 Enrichissement des processus, fonctions et composantes intracellulaires des 59 protéines qui sont augmentés dans le EDL WT versus EOM WT (p-value < 0.01; GOrilla)

GO PROCESSES			
GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	2,29E-13	2,02E-09
GO:0005996	monosaccharide metabolic process	2,50E-12	1,10E-08
GO:0016051	carbohydrate biosynthetic process	6,31E-12	1,85E-08
GO:0016052	carbohydrate catabolic process	1,33E-11	2,93E-08
GO:0019318	hexose metabolic process	2,01E-11	3,54E-08
GO:0006094	gluconeogenesis	3,26E-11	4,79E-08
GO:0046031	ADP metabolic process	6,21E-11	7,82E-08
GO:0009135	purine nucleoside diphosphate metabolic process	3,85E-10	3,39E-07
GO:0019319	hexose biosynthetic process	4,71E-10	3,46E-07
GO:0006165	nucleoside diphosphate phosphorylation	4,58E-10	3,67E-07
GO:0009179	purine ribonucleoside diphosphate metabolic process	3,85E-10	3,77E-07
GO:0006006	glucose metabolic process	5,77E-10	3,91E-07
GO:0009185	ribonucleoside diphosphate metabolic process	3,85E-10	4,24E-07
GO:0009132	nucleoside diphosphate metabolic process	1,23E-09	7,23E-07
GO:0046939	nucleotide phosphorylation	1,22E-09	7,71E-07
GO:0006090	pyruvate metabolic process	1,75E-09	9,67E-07
GO:0042866	pyruvate biosynthetic process	3,29E-09	1,45E-06
GO:0006096	glycolytic process	3,29E-09	1,53E-06
GO:0046364	monosaccharide biosynthetic process	2,99E-09	1,55E-06
GO:0006757	ATP generation from ADP	3,29E-09	1,61E-06
GO:0009166	nucleotide catabolic process	1,87E-08	7,87E-06
GO:0072525	pyridine-containing compound biosynthetic process	2,22E-08	8,17E-06
GO:0019359	nicotinamide nucleotide biosynthetic process	2,22E-08	8,53E-06
GO:0019363	pyridine nucleotide biosynthetic process	2,22E-08	8,92E-06
GO:0034404	nucleobase-containing small molecule biosynthetic process	4,23E-08	1,49E-05
GO:0046496	nicotinamide nucleotide metabolic process	5,44E-08	1,60E-05
GO:1901292	nucleoside phosphate catabolic process	4,77E-08	1,62E-05
GO:0072524	pyridine-containing compound metabolic process	5,44E-08	1,65E-05
GO:0019362	pyridine nucleotide metabolic process	5,44E-08	1,71E-05
GO:0046434	organophosphate catabolic process	5,37E-08	1,75E-05
GO:0044283	small molecule biosynthetic process	1,42E-07	4,04E-05
GO:0009168	purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	1,62E-07	4,32E-05
GO:0009127	purine nucleoside monophosphate biosynthetic process	1,62E-07	4,45E-05

GO:0009156	ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	1,98E-07	4,85E-05
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	1,89E-07	4,90E-05
GO:0009124	nucleoside monophosphate biosynthetic process	1,98E-07	4,99E-05
GO:0006796	phosphate-containing compound metabolic process	2,23E-07	5,31E-05
GO:0006733	oxidoreduction coenzyme metabolic process	2,34E-07	5,42E-05
GO:0072330	monocarboxylic acid biosynthetic process	2,42E-07	5,47E-05
GO:0006793	phosphorus metabolic process	2,66E-07	5,87E-05
GO:0009167	purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	6,06E-07	1,27E-04
GO:0009126	purine nucleoside monophosphate metabolic process	6,06E-07	1,30E-04
GO:0016310	phosphorylation	6,44E-07	1,32E-04
GO:0009161	ribonucleoside monophosphate metabolic process	7,04E-07	1,35E-04
GO:0009123	nucleoside monophosphate metabolic process	7,04E-07	1,38E-04
GO:1901135	carbohydrate derivative metabolic process	6,95E-07	1,39E-04
GO:0009142	nucleoside triphosphate biosynthetic process	8,70E-07	1,63E-04
GO:0046034	ATP metabolic process	1,02E-06	1,87E-04
GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	1,27E-06	2,29E-04
GO:0006754	ATP biosynthetic process	2,01E-06	3,54E-04
GO:0009205	purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	2,59E-06	4,48E-04
GO:0017144	drug metabolic process	2,76E-06	4,68E-04
GO:0009199	ribonucleoside triphosphate metabolic process	3,00E-06	4,99E-04
GO:0034655	nucleobase-containing compound catabolic process	3,16E-06	5,15E-04
GO:0009206	purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	3,78E-06	6,06E-04
GO:0009145	purine nucleoside triphosphate biosynthetic process	4,60E-06	7,12E-04
GO:0009201	ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	4,60E-06	7,25E-04
GO:0009144	purine nucleoside triphosphate metabolic process	5,22E-06	7,67E-04
GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process	5,22E-06	7,80E-04
GO:0016053	organic acid biosynthetic process	5,22E-06	7,93E-04
GO:0009152	purine ribonucleotide biosynthetic process	6,79E-06	9,81E-04
GO:0009141	nucleoside triphosphate metabolic process	7,71E-06	1,10E-03
GO:0009260	ribonucleotide biosynthetic process	9,90E-06	1,36E-03
GO:0006164	purine nucleotide biosynthetic process	9,90E-06	1,39E-03
GO:0072522	purine-containing compound biosynthetic process	1,12E-05	1,52E-03
GO:0046390	ribose phosphate biosynthetic process	1,26E-05	1,69E-03
GO:0046700	heterocycle catabolic process	1,43E-05	1,86E-03
GO:0044270	cellular nitrogen compound catabolic process	1,43E-05	1,89E-03
GO:0019637	organophosphate metabolic process	1,52E-05	1,95E-03
GO:0042180	cellular ketone metabolic process	2,28E-05	2,79E-03
GO:0046365	monosaccharide catabolic process	2,28E-05	2,83E-03

GO:0019320	hexose catabolic process	2,28E-05	2,87E-03
GO:0032411	positive regulation of transporter activity	2,90E-05	3,24E-03
GO:0044264	cellular polysaccharide metabolic process	2,88E-05	3,26E-03
GO:0044042	glucan metabolic process	2,88E-05	3,30E-03
GO:0019439	aromatic compound catabolic process	2,74E-05	3,32E-03
GO:0005977	glycogen metabolic process	2,88E-05	3,34E-03
GO:0005976	polysaccharide metabolic process	2,88E-05	3,39E-03
GO:0006073	cellular glucan metabolic process	2,88E-05	3,43E-03
GO:0009117	nucleotide metabolic process	3,23E-05	3,56E-03
GO:0051186	cofactor metabolic process	3,46E-05	3,77E-03
GO:0009165	nucleotide biosynthetic process	3,79E-05	4,08E-03
GO:0048741	skeletal muscle fiber development	4,02E-05	4,17E-03
GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process	3,97E-05	4,22E-03
GO:0034637	cellular carbohydrate biosynthetic process	4,02E-05	4,22E-03
GO:1901361	organic cyclic compound catabolic process	4,42E-05	4,54E-03
GO:1901293	nucleoside phosphate biosynthetic process	4,64E-05	4,70E-03
GO:0006732	coenzyme metabolic process	5,57E-05	5,59E-03
GO:0014904	myotube cell development	6,58E-05	6,52E-03
GO:1901137	carbohydrate derivative biosynthetic process	6,83E-05	6,69E-03
GO:0009108	coenzyme biosynthetic process	8,52E-05	8,26E-03
GO:0006112	energy reserve metabolic process	9,47E-05	9,08E-03
GO:0009150	purine ribonucleotide metabolic process	9,92E-05	9,31E-03
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	9,87E-05	9,36E-03
GO:1901021	positive regulation of calcium ion transmembrane transporter activity	1,01E-04	9,42E-03
GO:0055086	nucleobase-containing small molecule metabolic process	1,10E-04	1,01E-02
GO:0009259	ribonucleotide metabolic process	1,25E-04	1,14E-02
GO:0009438	methylglyoxal metabolic process	1,43E-04	1,26E-02
GO:0046184	aldehyde biosynthetic process	1,43E-04	1,27E-02
GO:0006000	fructose metabolic process	1,43E-04	1,28E-02
GO:0006081	cellular aldehyde metabolic process	1,55E-04	1,35E-02
GO:0006163	purine nucleotide metabolic process	1,57E-04	1,36E-02
GO:0034764	positive regulation of transmembrane transport	1,80E-04	1,54E-02
GO:0019693	ribose phosphate metabolic process	1,82E-04	1,54E-02
GO:1904064	positive regulation of cation transmembrane transport	2,03E-04	1,70E-02
GO:0034308	primary alcohol metabolic process	2,12E-04	1,74E-02
GO:0090407	organophosphate biosynthetic process	2,10E-04	1,75E-02
GO:0006816	calcium ion transport	2,37E-04	1,94E-02

GO:0032414	positive regulation of ion transmembrane transporter activity	2,41E-04	1,95E-02
GO:0034654	nucleobase-containing compound biosynthetic process	2,77E-04	2,22E-02
GO:0030388	fructose 1,6-bisphosphate metabolic process	2,80E-04	2,23E-02
GO:2001259	positive regulation of cation channel activity	2,91E-04	2,29E-02
GO:0072521	purine-containing compound metabolic process	2,97E-04	2,29E-02
GO:0051928	positive regulation of calcium ion transport	2,95E-04	2,30E-02
GO:0034767	positive regulation of ion transmembrane transport	3,20E-04	2,45E-02
GO:0051188	cofactor biosynthetic process	3,48E-04	2,64E-02
GO:0072511	divalent inorganic cation transport	4,86E-04	3,63E-02
GO:0070838	divalent metal ion transport	4,86E-04	3,66E-02
GO:0006734	NADH metabolic process	5,09E-04	3,78E-02
GO:2001257	regulation of cation channel activity	5,15E-04	3,79E-02
GO:0110096	cellular response to aldehyde	6,14E-04	4,44E-02
GO:0019242	methylglyoxal biosynthetic process	6,14E-04	4,47E-02
GO:0003012	muscle system process	6,36E-04	4,52E-02
GO:0019438	aromatic compound biosynthetic process	6,36E-04	4,56E-02
GO:1904427	positive regulation of calcium ion transmembrane transport	6,54E-04	4,61E-02

GO FUNCTION			
GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0004683	calmodulin-dependent protein kinase activity	4,31E-07	9,81E-04
GO:0005516	calmodulin binding	2,23E-06	2,54E-03
GO:0016301	kinase activity	4,50E-06	3,41E-03
GO:0005262	calcium channel activity	5,64E-06	3,21E-03
GO:0099604	ligand-gated calcium channel activity	1,48E-05	6,74E-03
GO:0004689	phosphorylase kinase activity	1,48E-05	5,62E-03
GO:0015278	calcium-release channel activity	1,48E-05	4,82E-03
GO:0016772	transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	2,24E-05	6,38E-03
GO:0015085	calcium ion transmembrane transporter activity	2,88E-05	7,29E-03
GO:0099094	ligand-gated cation channel activity	5,81E-05	1,32E-02
GO:0005217	intracellular ligand-gated ion channel activity	5,81E-05	1,20E-02
GO:0022839	ion gated channel activity	1,55E-04	2,94E-02
GO:0005261	cation channel activity	1,55E-04	2,71E-02
GO:0003824	catalytic activity	1,65E-04	2,68E-02
GO:0016773	phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	1,90E-04	2,88E-02
GO:0022836	gated channel activity	1,94E-04	2,76E-02

GO:0016616	oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	2,05E-04	2,75E-02
GO:0046873	metal ion transmembrane transporter activity	2,37E-04	3,00E-02
GO:0016614	oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	2,62E-04	3,15E-02
GO:0015276	ligand-gated ion channel activity	2,80E-04	3,19E-02
GO:0005245	voltage-gated calcium channel activity	2,80E-04	3,04E-02
GO:0016866	intramolecular transferase activity	4,82E-04	4,99E-02
GO:0022834	ligand-gated channel activity	4,82E-04	4,78E-02
GO:0004674	protein serine/threonine kinase activity	4,86E-04	4,61E-02
GO:0005216	ion channel activity	5,15E-04	4,70E-02
GO:0004368	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (quinone) activity	6,14E-04	5,38E-02
GO:0004367	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+] activity	6,14E-04	5,18E-02
GO:0016901	oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, quinone or similar compound as acceptor	6,14E-04	4,99E-02
GO:0050308	sugar-phosphatase activity	6,14E-04	4,82E-02
GO:0019203	carbohydrate phosphatase activity	6,14E-04	4,66E-02

GO COMPONENT			
GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0030018	Z disc	1,92E-06	2,39E-03
GO:0016529	sarcoplasmic reticulum	2,50E-06	1,55E-03
GO:0044449	contractile fiber part	3,14E-06	1,30E-03
GO:0005964	phosphorylase kinase complex	1,48E-05	4,59E-03
GO:1902554	serine/threonine protein kinase complex	5,81E-05	1,44E-02
GO:0030314	junctional membrane complex	5,81E-05	1,20E-02
GO:0034704	calcium channel complex	1,01E-04	1,80E-02
GO:0005891	voltage-gated calcium channel complex	1,43E-04	2,21E-02
GO:0061695	transferase complex, transferring phosphorus-containing groups	1,49E-04	2,06E-02

Tableau 5.3 Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 504 protéines qui sont augmentés dans le EOM WT versus EDL WT et SOD1 (protéines utilisées : p-value < 0.01; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla).

GO FONCTIONS				
GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0022857	transmembrane transporter activity	1,07E-11	2,44E-08	
GO:0005215	transporter activity	3,27E-10	3,73E-07	
GO:0015075	ion transmembrane transporter activity	6,22E-09	4,72E-06	
	inorganic molecular entity transmembrane transporter activity			
GO:0015318	activity	1,39E-08	7,93E-06	
GO:0008324	cation transmembrane transporter activity	4,13E-06	1,88E-03	
GO:0022804	active transmembrane transporter activity	5,12E-06	1,94E-03	
GO:0022890	inorganic cation transmembrane transporter activity	1,96E-05	6,39E-03	
GO:0016491	oxidoreductase activity	2,84E-05	8,08E-03	
GO:0008509	anion transmembrane transporter activity	7,13E-05	1,80E-02	
GO:0005509	calcium ion binding	9,57E-05	2,18E-02	
	monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity			
GO:0015077	activity	1,05E-04	2,17E-02	
GO:0048037	cofactor binding	1,10E-04	2,08E-02	
GO:0043492	ATPase activity, coupled to movement of substances	2,10E-04	3,68E-02	
GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	2,10E-04	3,41E-02	
	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances			
GO:0042626	movement of substances	2,10E-04	3,19E-02	
GO:0015399	primary active transmembrane transporter activity	2,23E-04	3,17E-02	
	P-P-bond-hydrolysis-driven transmembrane transporter activity			
GO:0015405	activity	2,23E-04	2,99E-02	
GO:0050662	coenzyme binding	2,77E-04	3,50E-02	
GO:0008514	organic anion transmembrane transporter activity	2,87E-04	3,44E-02	
GO:1901681	sulfur compound binding	3,31E-04	3,77E-02	
GO COMPONENT				
GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0005743	mitochondrial inner membrane	1,69E-12	2,10E-09	
GO:0019866	organelle inner membrane	1,89E-12	1,18E-09	
GO:0031966	mitochondrial membrane	3,29E-12	1,36E-09	
GO:0005739	mitochondrion	1,20E-11	3,71E-09	
GO:0031090	organelle membrane	3,28E-11	8,15E-09	
GO:0044429	mitochondrial part	8,78E-11	1,82E-08	
GO:0016020	membrane	3,29E-08	5,83E-06	
GO:0043209	myelin sheath	2,27E-07	3,52E-05	
GO:0031224	intrinsic component of membrane	1,47E-06	2,03E-04	
GO:0016021	integral component of membrane	3,33E-06	4,13E-04	
GO:0044425	membrane part	4,83E-06	5,45E-04	

GO:0044455	mitochondrial membrane part	2,82E-05	2,91E-03
GO:0098798	mitochondrial protein complex	3,87E-05	3,70E-03
GO:0044420	extracellular matrix component	1,74E-04	1,54E-02
GO:0098800	inner mitochondrial membrane protein complex	2,48E-04	2,05E-02
GO:0099056	integral component of presynaptic membrane	6,92E-04	5,36E-02

Tableau 5.4 Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 32 protéines qui sont augmentés dans le EDL WT versus EOM WT et SOD1 (protéines utilisées : p-value < 0.01; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla).

GO PROCESSES			
GO Term	Description	P-value	FDR q-value
GO:0046031	ADP metabolic process	3,21E-10	2,83E-06
GO:0016052	carbohydrate catabolic process	1,31E-09	5,77E-06
GO:0009185	ribonucleoside diphosphate metabolic process	1,31E-09	3,85E-06
GO:0009179	purine ribonucleoside diphosphate metabolic process	1,31E-09	2,89E-06
GO:0009135	purine nucleoside diphosphate metabolic process	1,31E-09	2,31E-06
GO:0009132	nucleoside diphosphate metabolic process	3,23E-09	4,75E-06
GO:0006165	nucleoside diphosphate phosphorylation	4,80E-09	6,05E-06
GO:0046939	nucleotide phosphorylation	9,93E-09	1,09E-05
GO:0019318	hexose metabolic process	1,50E-08	1,47E-05
GO:0005996	monosaccharide metabolic process	2,90E-08	2,56E-05
GO:0034404	nucleobase-containing small molecule biosynthetic process	5,31E-08	4,26E-05
GO:0006006	glucose metabolic process	5,97E-08	4,39E-05
GO:0006757	ATP generation from ADP	6,97E-08	4,73E-05
GO:0006096	glycolytic process	6,97E-08	4,39E-05
GO:0042866	pyruvate biosynthetic process	6,97E-08	4,10E-05
GO:0009166	nucleotide catabolic process	7,72E-08	4,25E-05
GO:0006090	pyruvate metabolic process	1,25E-07	6,49E-05
GO:1901292	nucleoside phosphate catabolic process	1,57E-07	7,71E-05
GO:0072330	monocarboxylic acid biosynthetic process	2,17E-07	1,01E-04
GO:0019363	pyridine nucleotide biosynthetic process	2,69E-07	1,19E-04
GO:0019359	nicotinamide nucleotide biosynthetic process	2,69E-07	1,13E-04
GO:0072525	pyridine-containing compound biosynthetic process	2,69E-07	1,08E-04
GO:0046034	ATP metabolic process	7,00E-07	2,68E-04
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	9,76E-07	3,59E-04
GO:0046434	organophosphate catabolic process	1,27E-06	4,49E-04
GO:0009142	nucleoside triphosphate biosynthetic process	1,49E-06	5,06E-04
GO:0009205	purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	1,51E-06	4,92E-04
GO:0009199	ribonucleoside triphosphate metabolic process	1,70E-06	5,35E-04
GO:0006094	gluconeogenesis	2,02E-06	6,15E-04
GO:0016053	organic acid biosynthetic process	2,69E-06	7,90E-04
GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process	2,69E-06	7,65E-04
GO:0009126	purine nucleoside monophosphate metabolic process	2,69E-06	7,41E-04
GO:0009144	purine nucleoside triphosphate metabolic process	2,69E-06	7,19E-04

GO:0009167	purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	2,69E-06	6,97E-04
GO:0009127	purine nucleoside monophosphate biosynthetic process	2,72E-06	6,85E-04
GO:0009168	purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	2,72E-06	6,66E-04
GO:0009123	nucleoside monophosphate metabolic process	3,00E-06	7,16E-04
GO:0009161	ribonucleoside monophosphate metabolic process	3,00E-06	6,97E-04
GO:0017144	drug metabolic process	3,09E-06	6,98E-04
GO:0009124	nucleoside monophosphate biosynthetic process	3,13E-06	6,90E-04
GO:0009156	ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	3,13E-06	6,73E-04
GO:0009141	nucleoside triphosphate metabolic process	3,72E-06	7,82E-04
GO:0034655	nucleobase-containing compound catabolic process	4,11E-06	8,43E-04
GO:0016051	carbohydrate biosynthetic process	4,85E-06	9,73E-04
GO:0019319	hexose biosynthetic process	5,95E-06	1,17E-03
GO:0019362	pyridine nucleotide metabolic process	6,86E-06	1,32E-03
GO:0072524	pyridine-containing compound metabolic process	6,86E-06	1,29E-03
GO:0046496	nicotinamide nucleotide metabolic process	6,86E-06	1,26E-03
GO:0006754	ATP biosynthetic process	7,26E-06	1,31E-03
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	8,99E-06	1,59E-03
GO:0009206	purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	1,16E-05	2,01E-03
GO:0009201	ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	1,35E-05	2,29E-03
GO:0009145	purine nucleoside triphosphate biosynthetic process	1,35E-05	2,25E-03
GO:0044270	cellular nitrogen compound catabolic process	1,37E-05	2,24E-03
GO:0046700	heterocycle catabolic process	1,37E-05	2,20E-03
GO:0046364	monosaccharide biosynthetic process	1,38E-05	2,17E-03
GO:0006733	oxidoreduction coenzyme metabolic process	1,70E-05	2,63E-03
GO:0019439	aromatic compound catabolic process	2,32E-05	3,52E-03
GO:0046184	aldehyde biosynthetic process	2,35E-05	3,52E-03
GO:0009438	methylglyoxal metabolic process	2,35E-05	3,46E-03
GO:0044283	small molecule biosynthetic process	2,61E-05	3,77E-03
GO:1901361	organic cyclic compound catabolic process	3,41E-05	4,85E-03
GO:0009152	purine ribonucleotide biosynthetic process	3,74E-05	5,24E-03
GO:0006164	purine nucleotide biosynthetic process	4,90E-05	6,75E-03
GO:0009260	ribonucleotide biosynthetic process	4,90E-05	6,64E-03
GO:0072522	purine-containing compound biosynthetic process	5,34E-05	7,14E-03
GO:0046390	ribose phosphate biosynthetic process	5,82E-05	7,66E-03
GO:1901135	carbohydrate derivative metabolic process	8,72E-05	1,13E-02
GO:0019637	organophosphate metabolic process	1,08E-04	1,38E-02
GO:0009150	purine ribonucleotide metabolic process	1,25E-04	1,57E-02

GO:0009108	coenzyme biosynthetic process	1,25E-04	1,55E-02
GO:0019320	hexose catabolic process	1,28E-04	1,57E-02
GO:0046365	monosaccharide catabolic process	1,28E-04	1,55E-02
GO:0009165	nucleotide biosynthetic process	1,28E-04	1,53E-02
GO:1901293	nucleoside phosphate biosynthetic process	1,49E-04	1,75E-02
GO:0016310	phosphorylation	1,49E-04	1,73E-02
GO:0009259	ribonucleotide metabolic process	1,49E-04	1,71E-02
GO:0006163	purine nucleotide metabolic process	1,78E-04	2,01E-02
GO:0006081	cellular aldehyde metabolic process	1,84E-04	2,06E-02
GO:0019242	methylglyoxal biosynthetic process	1,85E-04	2,04E-02
GO:1901137	carbohydrate derivative biosynthetic process	1,97E-04	2,14E-02
GO:0006796	phosphate-containing compound metabolic process	1,97E-04	2,11E-02
GO:0019693	ribose phosphate metabolic process	1,99E-04	2,12E-02
GO:0006793	phosphorus metabolic process	2,16E-04	2,27E-02
GO:0090407	organophosphate biosynthetic process	2,23E-04	2,31E-02
GO:0009117	nucleotide metabolic process	2,63E-04	2,70E-02
GO:0051186	cofactor metabolic process	2,75E-04	2,79E-02
GO:0034654	nucleobase-containing compound biosynthetic process	2,77E-04	2,78E-02
GO:0072521	purine-containing compound metabolic process	2,92E-04	2,90E-02
GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process	3,02E-04	2,96E-02
GO:0042180	cellular ketone metabolic process	3,10E-04	3,00E-02
GO:0051188	cofactor biosynthetic process	3,75E-04	3,59E-02
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	3,98E-04	3,77E-02
GO:0019438	aromatic compound biosynthetic process	5,32E-04	4,99E-02

Tableau 5.5 Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 231 protéines qui sont exclusivement différentes entre le WT et SOD1 chez l'EDL (protéines utilisées : p-value < 0.05; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla).

GO PROCESS				
GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0030163	protein catabolic process	6,22E-07	5,80E-03	
GO:0009057	macromolecule catabolic process	4,64E-06	2,16E-02	
GO:0010498	proteasomal protein catabolic process	6,22E-06	1,93E-02	
GO:0043161	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	6,92E-06	1,61E-02	
GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	1,55E-05	2,89E-02	
GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	2,80E-05	4,36E-02	
GO:0019941	modification-dependent protein catabolic process	3,32E-05	4,42E-02	
GO:0043632	modification-dependent macromolecule catabolic process	3,84E-05	4,48E-02	
GO:0044265	cellular macromolecule catabolic process	4,16E-05	4,31E-02	
GO COMPONENT				
GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0005737	cytoplasm	1,60E-08	2,09E-05	
GO:0000502	proteasome complex	1,81E-07	1,19E-04	
GO:1905369	endopeptidase complex	1,81E-07	7,90E-05	
GO:1905368	peptidase complex	4,83E-07	1,59E-04	
GO:0022624	proteasome accessory complex	2,53E-06	6,64E-04	
GO:0005838	proteasome regulatory particle	5,39E-05	1,18E-02	
GO:0005643	nuclear pore	5,40E-05	1,01E-02	
GO:0008540	proteasome regulatory particle, base subcomplex	1,10E-04	1,81E-02	
GO:0005634	nucleus	2,47E-04	3,60E-02	

Tableau 5.6 Enrichissement des fonctions et composantes intracellulaires des 207 protéines qui sont différentes entre le WT et SOD1 chez l'EDL ainsi que différente entre l'EDL et l'EOM chez le WT et chez le SOD1 (protéines utilisées : p-value < 0.05; Enrichissement gardé : FDR q-value < 0.05 : GOrilla).

GO PROCESS				
GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0017144	drug metabolic process	9,23E-12	8,60E-08	
GO:0044281	small molecule metabolic process	2,16E-11	1,01E-07	
GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	1,15E-10	3,58E-07	
GO:0006101	citrate metabolic process	2,45E-10	5,71E-07	
GO:0006082	organic acid metabolic process	3,02E-10	5,63E-07	
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	9,90E-10	1,54E-06	
GO:0072350	tricarboxylic acid metabolic process	1,80E-09	2,39E-06	
GO:0043436	oxoacid metabolic process	2,15E-09	2,51E-06	
GO:0016999	antibiotic metabolic process	1,11E-07	1,15E-04	
GO:0043648	dicarboxylic acid metabolic process	1,29E-07	1,20E-04	
GO:0055114	oxidation-reduction process	1,30E-07	1,10E-04	
GO:0016054	organic acid catabolic process	1,98E-07	1,54E-04	
GO:0046395	carboxylic acid catabolic process	1,98E-07	1,42E-04	
GO:0044282	small molecule catabolic process	2,04E-06	1,36E-03	
GO:0006102	isocitrate metabolic process	2,26E-06	1,40E-03	
GO:0072329	monocarboxylic acid catabolic process	3,18E-06	1,85E-03	
GO:0009063	cellular amino acid catabolic process	4,09E-06	2,24E-03	
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	6,75E-06	3,49E-03	
GO:0006103	2-oxoglutarate metabolic process	6,89E-06	3,38E-03	
GO:0009083	branched-chain amino acid catabolic process	1,40E-05	6,52E-03	
GO:0009081	branched-chain amino acid metabolic process	1,40E-05	6,21E-03	
GO:0006635	fatty acid beta-oxidation	1,78E-05	7,56E-03	
GO:0055086	nucleobase-containing small molecule metabolic process	2,09E-05	8,48E-03	
GO:0034440	lipid oxidation	3,63E-05	1,41E-02	
GO:0019395	fatty acid oxidation	3,63E-05	1,35E-02	
GO:0009117	nucleotide metabolic process	4,81E-05	1,73E-02	
GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process	6,53E-05	2,25E-02	
GO:0009062	fatty acid catabolic process	9,01E-05	3,00E-02	
GO FUNCTION				
GO Term	Description	P-value	FDR value	q-
GO:0016491	oxidoreductase activity	1,05E-07	2,59E-04	
GO:0003824	catalytic activity	4,09E-07	5,06E-04	
GO:0048037	cofactor binding	1,92E-06	1,58E-03	
GO:0009055	electron transfer activity	1,79E-05	1,11E-02	
GO:0051540	metal cluster binding	2,55E-05	1,26E-02	

GO:0051536	iron-sulfur cluster binding	2,55E-05	1,05E-02
GO:0004448	isocitrate dehydrogenase activity	3,07E-05	1,09E-02
GO:0050662	coenzyme binding	1,74E-04	5,39E-02
GO:0051082	unfolded protein binding	1,76E-04	4,84E-02
GO COMPONENT			
GO Term	Description	P-value	FDR value q-
GO:0005739	mitochondrion	5,00E-27	6,56E-24
GO:0044429	mitochondrial part	3,67E-16	2,41E-13
GO:0005743	mitochondrial inner membrane	3,73E-10	1,63E-07
GO:0031966	mitochondrial membrane	4,47E-10	1,47E-07
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	6,50E-10	1,71E-07
GO:0019866	organelle inner membrane	1,03E-09	2,26E-07
GO:0005759	mitochondrial matrix	1,09E-09	2,04E-07
GO:0043227	membrane-bounded organelle	1,18E-09	1,93E-07
GO:0043233	organelle lumen	1,07E-08	1,56E-06
GO:0070013	intracellular organelle lumen	1,07E-08	1,41E-06
GO:0031974	membrane-enclosed lumen	1,07E-08	1,28E-06
GO:0098798	mitochondrial protein complex	3,10E-07	3,39E-05
GO:0043229	intracellular organelle	1,38E-06	1,39E-04
GO:0043226	organelle	3,70E-06	3,47E-04
GO:0031090	organelle membrane	5,66E-06	4,95E-04
GO:0044455	mitochondrial membrane part	8,25E-06	6,77E-04
GO:1990204	oxidoreductase complex	7,49E-05	5,79E-03
GO:0044444	cytoplasmic part	1,04E-04	7,57E-03
	mitochondrial proton-transporting ATP synthase		
GO:0000275	complex, catalytic core F(1)	1,45E-04	9,99E-03
GO:0016011	dystroglycan complex	1,45E-04	9,49E-03
	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic		
GO:0045261	core F(1)	1,45E-04	9,04E-03
GO:0045275	respiratory chain complex III	2,22E-04	1,32E-02
GO:0045259	proton-transporting ATP synthase complex	2,97E-04	1,70E-02
	mitochondrial proton-transporting ATP synthase		
GO:0005753	complex	2,97E-04	1,63E-02
GO:0098800	inner mitochondrial membrane protein complex	3,01E-04	1,58E-02
GO:0045251	electron transfer flavoprotein complex	4,16E-04	2,10E-02
GO:0017133	mitochondrial electron transfer flavoprotein complex	4,16E-04	2,02E-02
GO:0005777	peroxisome	5,04E-04	2,36E-02
GO:0045239	tricarboxylic acid cycle enzyme complex	7,17E-04	3,25E-02
GO:0042579	microbody	8,84E-04	3,87E-02
GO:0045240	dihydrolipoyl dehydrogenase complex	8,97E-04	3,80E-02